ETUDE STÉREOCHIMIQUE DE LA BIOSYNTHÈSE DE LA L-SÉRINE

PAR

FRANCIS SCHUBER

STRASBOURG 1967

N° d'ordre

THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR -ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

FRANCIS SCHUBER
ATTACHÉ DE RECHERCHES AU CNRS

PREMIÈRE THÈSE

ETUDE STÉREOCHIMIQUE DE LA BIOSYNTHÈSE DE LA L-SÉRINE

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 17. juillet 1967 devant la commission d'Examen:

MM. J. P. EBEL	Président
J. F. BIELLMANN	Membre du Jury
H. DURANTON	Membre du Jury
G. OURISSON	Membre Invité
D. ARIGONI	Membre Invité

Imprimé Berenz
Représentant: M. Kiefer – Nouvelle Cité 17 – 67 Lingolsheim

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DES SCIENCES

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN

Doyens Honoraires : A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT.

Professeurs Honoraires : P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, Mle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P.L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch.SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférences Honoraire : R. WEIL.

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE.....	T.	Biologie végétale
A.ROUSSEL.....	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER.....	T.	Chimie générale
J. ROTHE.....	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE.....	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN.....	T.	Zoologie et Embryologie experimentale
A. MAILLARD.....	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY.....	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN.....	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE.....	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD.....	T.	Chimie Organique
Mle M. PEREY.....	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB.....	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY.....	T.	Biologie générale
H. BENOIT.....	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER.....	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT.....	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET.....	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER.....	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER.....	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU.....	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE.....	T.	Physique générale
F. STUTINSKY.....	T.	Physiologie générale
B. WURTZ.....	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET.....	T.	Electrochimie
G. OURISSON.....	T.T.P.	Chimie
Cl. LEVI.....	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE.....	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF.....	T.	Physique générale
J. FRENKEL.....	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG.....	T.	Physique
J.P. LONCHAMP.....	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE.....	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET.....	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER.....	T.T.P.	Physique
A. ROCHE.....	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH.....	T.	Microbiologie
A. SIGOT.....	P.S.C.	Zoologie

J. COGNE..... T.T.P. Géologie
A. FUCHS..... T. Mécanique rationnelle
A. GALLMANN..... T.T.P. Physique
P. MIALHE..... T.T.P..Physiologie animale
J.F. EBEL..... T. Chimie biologique
J. PARROD..... T.T.P. Chimie
R. WEY..... T.T.P. Chimie
Mme D. MAGNAC..... T.T.P. Physique
M. DAUNE..... P.S.C. Physique
J.P. ADLOFF..... T.T.P. Chimie nucléaire
D. BERNARD..... T.T.P. Méthodes mathématiques de la physique
M. ZISMAN..... T.T.P. Mathématiques
E. DANIEL..... T. Physique expérimentale
P. CHEVALLIER..... P.S.C. Physique
J. GREMILLARD..... T.T.P. Mathématiques
P. CARTIER..... T. Mathématiques M.P.C.
G. REEB..... T. Topologie
F. NORGUET..... T. Analyse supérieure
R. CHAUVIN..... T. Psychophysiologie
J. WUCHER..... P.S.C. Physique
Mme M. BRINI..... P.S.C. Chimie
G. PERNY..... P.S.C. Physique
R. BARO..... P.S.C. Physique
H. DURANTON..... P.S.C. Botanique
R. WEISS..... T.T.P. Chimie
P. FEDERLIN..... T.T.P. Chimie
J. LERAY..... P.S.C. Physique
J.P. SCHWING..... P.S.C. Chimie
M. SIESKIND..... P.S.C. Physique
G. MONSONEGO..... P.S.C. Physique mathématique
P. GABRIEL..... T.T.P. Mathématiques
C. WIPPLER..... T. Physicochimie des Hauts Polymères Industriels
P.A. MEYER..... T.T.P. Mathématiques
G. WEILL..... P.S.C. Physique
J.M. BLOCH..... T. Chimie
A. CLAUSS..... P.S.C. Chimie
R. OMNES..... P.S.C. Physique théorique
E. FOLLENIUS..... P.S.C. Zoologie
J. LUCAS..... P.S.C. Géologie

Professeurs associés :

S.R. DE GROOT..... Physique nucléaire
K. VESELY..... Physicochimie macromoléculaire

Maîtres de Conférences :

H. DANAN..... Physique
Mme WINTER Chr. ..... Physique
J.P. EBERHART..... Minéralogie
Mme D. CAGNIANT..... Chimie
X. FERNIQUE..... Mathématiques
J. STREITH..... Chimie
J. WEIL..... Chimie biologique
F. GAUTIER..... Physique propédeutique
G. SUTTER..... Physique électronique
D. FOATA..... Mathématiques
J.L. VERDIER..... Mathématiques
J.M. LEHN..... Chimie
Cl. ROBERT..... Physique

Maîtres de Conférences Associés :

V. AVANISSIAN..... Mathématiques
R.A. MASSY-WESTROPP..... Chimie Organique

Secrétaire : G. SAINT-PE.

A mes parents,

à Marie,

et à tous nos amis.

Monsieur J.F. BIELLMANN , Maître de Recherches au CNRS

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour la formation que vous m'avez donnée.

Je suis heureux de compter parmi vos premiers élèves et collaborateurs et d'être de vos amis.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550018_0054

Monsieur le Professeur G. OURISSON

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueilli dans votre groupe, et m'avoir fait profiter d'un climat scientifique et humain exceptionnel.

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde estime.

Je remercie tous mes camarades de laboratoire qui ont collaboré à ce travail par leur aide, leurs conseils et leur précieuse amitié.

La réalisation de ce travail a largement bénéficié des conseils de Messieurs les Professeurs H. DURANTON et J. WEIL et de l'aide de Mesdames J. BAKES et N.BEFORD, de Messieurs M. LEDIG et F. URBAN. Je les en remercie vivement.

A B R E V I A T I O N S

NAD = forme oxydée
NADH = forme réduite
} de l'adénine-nicotamide-dinucléotide

NADP = forme oxydée
NADPH = forme réduite
} du phosphate d'adénine-nicotamide-dinucléotide

P-Pal = phosphate de pyridoxal

P = phosphate

LDH = L-lactate : NAD oxydoréductase (1.1.1.27)

ADH = alcool : NAD oxydoréductase (1.1.1.1)

H_4folate = (-)-L-5,6,7,8-tétrahydrofolate

10-HCO-H_4folate = 10-formyltétrahydrofolate

5,10-CH=H_4folate = 5,10-méthényltétrahydrofolate

5,10-CH_2-H_4folate = 5,10-méthylènetétrahydrofolate

ATP = adénosine triphosphate

ADP = adénosine diphosphate

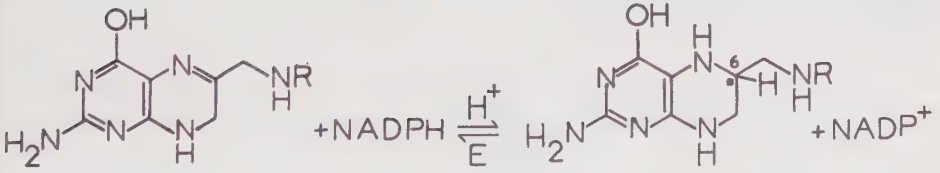
E = enzyme

I N T R O D U C T I O N

GENERALITES

Les réactions enzymatiques sont très généralement stéréospécifiques. Lorsqu'une réaction a lieu sur un carbone asymétrique, l'enzyme possède un très haut degré de préférence pour l'un des deux stéréoisomères (antipodes ou diastéréoisomères). De même, de nombreuses réactions aboutissent, à partir de substrats non chiraux, à des produits de pureté optique très élevée.

Exemple : la réduction de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique :



L-H_2 folate

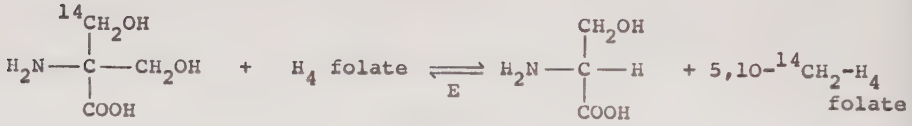
(-)-L-H_4folate

E = 5,6,7,8-tétrahydrofolate : NADP-oxydoréductase (E.C.1.5.1.3)

L'hydrogène transféré du NADPH se fixe en 6, et la réaction produit un seul diastéréoisomère (1,2). La configuration absolue en C-6 n'est pas connue.

Cette propriété s'étend au cas des carbones "méso" ($Cxyz_2$) dans lesquels l'enzyme distingue les deux substituants identiques z, qui ne diffèrent que par leur configuration relative. L'étude de ce type de réactions a été rendue possible par l'utilisation des marquages isotopiques.

Exemple : l'interconversion de l'α-hydroxyméthylsérine et de la D-sérine



E = α-hydroxyméthylsérine hydroxyméthylase

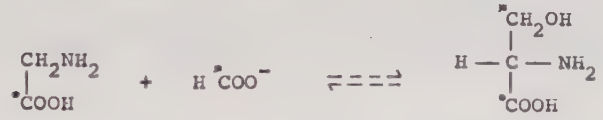
L'enzyme E distingue les deux groupes hydroxyméthyles et en transfère un seul, spécifiquement. La stéréochimie de la réaction n'a pas encore été établie dans ce cas.

La notion de stéréosélectivité est donc une donnée primordiale dans l'étude des mécanismes enzymatiques. Ainsi la connaissance de la stéréosélectivité d'une réaction permet quelquefois de préciser la nature de son mécanisme : élimination, substitution, etc... Rose a développé l'idée qui consiste à dissocier la stéréospécificité de l'action enzymatique (totale) de la stéréochimie globale de la réaction ; ainsi l'observation d'une racémisation peut refléter l'existence d'une étape non-enzymatique, non-spécifique, au cours du mécanisme général (4).

Dans cet esprit, nous avons étudié la stéréochimie de la biosynthèse de la L-sérine. Les étapes de la synthèse de la L-sérine à partir du formiate et de la glycine sont relativement bien connues ; par contre les mécanismes ne le sont guère. Des hypothèses ont été avancées qui reposent essentiellement sur des analogies et des réactions modèles (5 - 7). Nous avons pensé que la connaissance du déroulement stéréochimique de la biosynthèse de la L-sérine serait utile pour établir le mécanisme de ces réactions enzymatiques où interviennent l'acide tétrahydrofolique et le phosphate de pyridoxal.

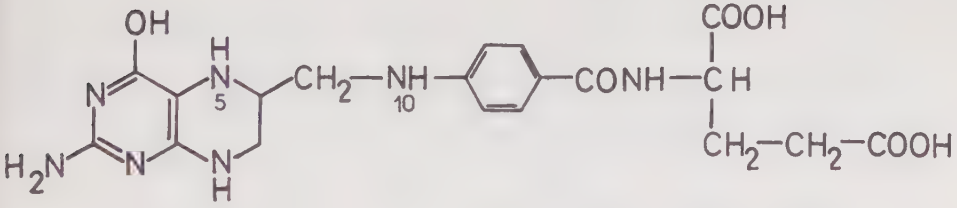
L'INTERCONVERSION DE LA L-SERINE ET DE LA GLYCINE

En 1946, Shemin montrait que la L-sérine 1 était transformée *in vivo* en glycine 2 (8), puis Sakami établissait que la L-sérine pouvait être synthétisée *in vivo* à partir de la glycine et du formiate (9). L'interconversion de la L-sérine et de la glycine était ainsi démontrée :



2 ⇌ 1

Cette interconversion fut ensuite étudiée *in vitro* (tranches de foie de rat, homogénats de foie de rat, etc...), et l'on put prouver qu'à côté du formiate existaient d'autres précurseurs du C-3 de la L-sérine : formaldéhyde, C-α de la glycine, etc... Bien vite, il apparut que la réaction ne pouvait être dissociée de la présence d'acide tétrahydrofolique (H_4 folate) 3 (10) :



3

L'acide tétrahydrofolique est le coenzyme responsable du transfert des unités monocarbonées : formyle, hydroxyméthyle, méthyle, etc.. (Revues : 11 - 17).

A/ LA BIOSYNTHESE DE LA L-SERINE A PARTIR DE LA GLYCINE ET DU FORMIATE :

Les grandes lignes de la biosynthèse sont aujourd'hui connues. Les produits intermédiaires ont été isolés, identifiés et synthétisés. D'autre part, grâce à l'isolement des enzymes, on a pu reproduire séparément les diverses étapes enzymatiques intervenant dans la biosynthèse. L'acide tétrahydrofolique joue un rôle essentiel : il active le formiate avec lequel il forme des composés d'addition (10-formyltétrahydrofolate ; 5,10-méthényltétrahydrofolate), puis il permet la réduction du groupe formyle au degré d'oxydation du formaldéhyde (5,10-méthylènetétrahydrofolate). Ce dérivé réagit avec la glycine en présence d'une enzyme pour donner la L-sérine.

Pour situer notre étude dans son contexte, nous allons décrire brièvement les réactions que nous venons d'évoquer.

1 - Formation du 5,10-méthylènetétrahydrofolate 6 :

Nous avons représenté dans le tableau ci-contre les étapes menant du formiate au méthylènetétrahydrofolate. Notons que l'acide tétrahydrofolique présente un centre d'asymétrie en 6 et qu'un seul des antipodes possède une activité biologique: (-)-L-tétrahydrofolate (1,2)

- 10-formyltétrahydrofolate 4 :

$$HCOO^- + ATP + H_4 \text{ folate} \underset{E}{\rightleftharpoons} 10\text{-}HCO\text{-}H_4 \text{ folate} + ADP + Pi$$

Le formiate réagit avec l'acide tétrahydrofolique pour donner l'amide en 10. Cette réaction se fait en présence d'une enzyme, la formiate tétrahydrofolate ligase (ADP) (6.3.4.3), et nécessite de l'ATP (18 - 21).

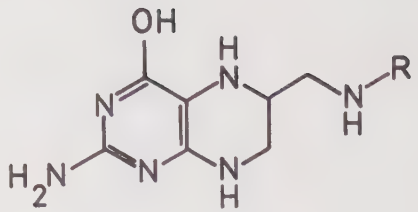
- 5,10-méthényltétrahydrofolate 5 :

$$10\text{-}HCO\text{-}H_4 \text{ folate} + H^+ \underset{E}{\rightleftharpoons} 5,10\text{-}CH{=}H_4\text{folate} + H_2O$$

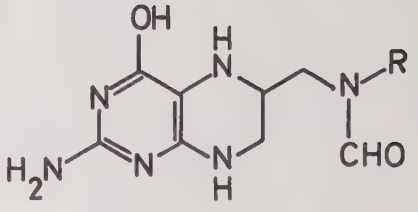
Cette réaction est spontanée en milieu acide, mais dans la cellule elle s'effectue en présence d'une enzyme, la 5,10-méthényltétrahydrofolate-hydrolase (3.5.4.9) (22,23).

- 5,10-méthylènetétrahydrofolate 6 :

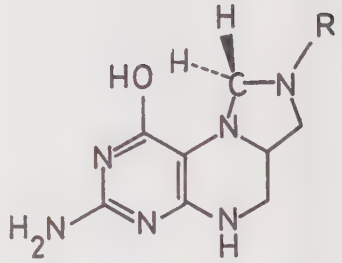
$$5,10\text{-}CH{=}H_4\text{folate} + NADPH \underset{E}{\rightleftharpoons} 5,10\text{-}CH_2\text{-}H_4\text{folate} + NADP^+$$



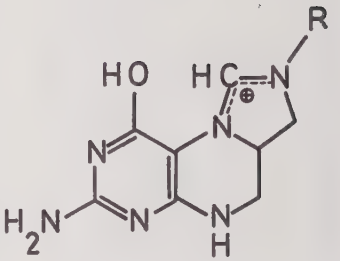
3



4



6



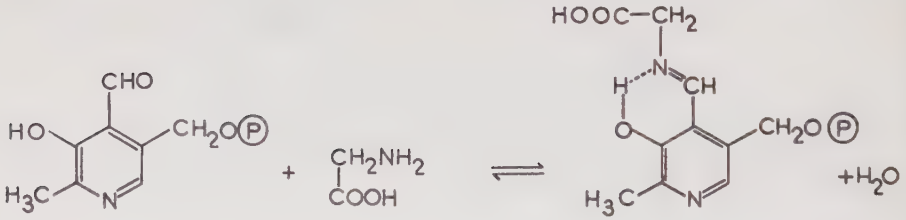
5

E = 5,10-méthylènetétrahydrofolate : NADP-oxydoréductase (1.5.1.5)

Par cette réaction, le formyle est réduit ; en effet, le pont méthylénique possède le degré d'oxydation du formaldéhyde (24). Notons que l'acide tétrahydrofolique, en présence de formaldéhyde, donne spontanément ce dérivé (25-27).

2 - Activation de la glycine :

La glycine donne en présence de phosphate de pyridoxal 7 une base de Schiff 8 qui représente la forme active de cet acide aminé.



7 8

3 - La transhydroxyméthylation :

$$5,10\text{-}CH_2\text{-}H_4\text{folate} + \text{glycine-P-Pal} \xrightleftharpoons[E]{2\,H_2O} \text{L-sérine} + \text{P-Pal} + H_4\text{folate}$$

C'est la réaction de synthèse proprement dite : les deux substrats activés réagissent en présence d'une enzyme, la L-sérine transhydroxyméthylase (2.1.2.1), pour donner la L-sérine (28a, 28b, 29). Au terme de cette réaction, le groupe méthylène constitue le C-3 de la L-sérine.

B/ BUT DE NOTRE TRAVAIL : DETERMINATION DE LA STEREOCHIMIE DE LA TRANSHYDROXYMETHYLATION

L'étude de la stéréochimie des réactions ci-dessus n'a guère été développée. Blakley et coll. (24) ont montré que la réduction (a)

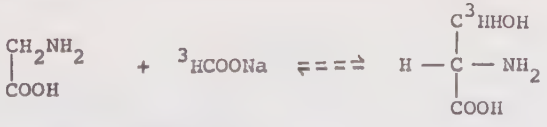
(a) 5,10-CH=H_4folate + NADPH $\underset{E}{\rightleftharpoons}$ 5,10-CH_2-H_4folate + $NADP^+$

(5 ⟶ 6), catalysée par l'enzyme extraite de la levure, est stéréospécifique pour la face A du coenzyme*. Si cette réduction est stéréospécifique par rapport au méthényltétrahydrofolate, alors les deux hydrogènes du pont méthylénique (qui n'ont pas la même configuration, cf.figure), ont une origine différente : l'un proviendrait du formiate, l'autre du NADPH ; ils doivent pouvoir être distingués si l'on marque l'un d'eux. Mais le méthylènetétrahydrofolate se racémise facilement (équation b)(25);

(b) 5,10-CH_2-H_4folate + H_2O $\rightleftharpoons$ H_4folate + HCHO (non-enzymatique)

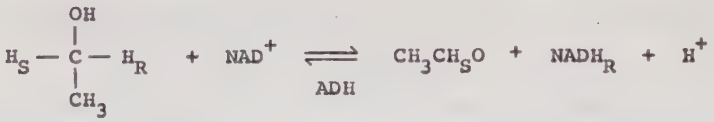
ceci rend impossible toute étude de la stéréochimie de la réaction (a) par rapport à ce substrat. Cependant, on peut utiliser ce méthylènetétrahydrofolate pour la transhydroxyméthylation et voir si la configuration du groupe méthylène est conservée dans le C-3 de la L-sérine. Ceci suppose que cette dernière réaction soit également stéréospécifique et que sa vitesse de réaction soit au moins du même ordre de grandeur que celle de la racémisation du méthylènetétrahydrofolate. S'il n'en était pas ainsi, les deux hydrogènes du pont méthylénique de 6, donc du C-3 de la L-sérine, seraient identiques du point de vue de leur origine.

Le but de notre travail est d'étudier la stéréospécificité de la réduction (a) et de la transhydroxyméthylation, donc de déterminer la configuration absolue de l'hydrogène marqué dans l'hydroxyméthyle de la L-sérine, en partant d'un substrat marqué, ici le formiate.



* pour la nomenclature voir réf. 30

La détermination de cette configuration peut se faire suivant plusieurs méthodes. Par suite de la nature du marquage (tritium), donc de la forte dilution isotopique, nous avons fait appel à une méthode enzymatique, consistant à oxyder l'éthanol en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase. Le déroulement stéréochimique de cette réaction a été établi (31, 32) :



L'hydrogène de configuration S dans l'éthanol reste sur l'acétaldéhyde ; l'hydrogène R est transféré sur le coenzyme *.

Il nous fallait donc passer de la L-sérine à l'éthanol. Nous avons effectué ce passage par dégradation chimique :

Nous avons montré que les réactions biochimiques de la biosynthèse de la L-sérine sont stéréospécifiques et que, dans l'oxydation enzymatique de l'éthanol-1-^{3}H en acétaldéhyde, il existe un effet isotopique secondaire cinétique.

* Nomenclature : Configuration absolue d'un substituant z porté par un carbone "méso" Cxyz$_2$: on rend formellement le carbone asymétrique en attribuant le rang supérieur des z au substituant z dont on veut définir la configuration; puis on détermine la configuration absolue du carbone selon la règle de chiralité de Cahn, Ingold et Prelog (33). Suivant qu'il se révèle R ou S, on donne à z la configuration R ou S (111).

Pour l'exposé de ce travail, nous adopterons le plan suivant :

CHAPITRE I : Détermination de la configuration absolue du tritium dans la L-sérine-3-^{3}H. Méthodes et résultats.

CHAPITRE II : Déroulement stéréochimique de la biosynthèse de la L-sérine.

CHAPITRE III : Etude de l'effet isotopique secondaire cinétique.

C H A P I T R E I

DETERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE DU TRITIUM PROVENANT DU FORMIATE DANS LA L-SERINE-3-^{3}H.

METHODES ET RESULTATS

Nous avons vu au cours de l'introduction que l'on pourrait déterminer la stéréospécificité des réactions enzymatiques étudiées en connaissant la configuration absolue du C-3 de la L-sérine. Pour différencier les deux hydrogènes diastéréoisomères de l'hydroxyméthyle de la L-sérine, nous avons marqué l'un d'eux, celui provenant du formiate, au tritium. Le plan de ce premier chapitre sera le suivant :

1 - Préparation de la L-sérine-3-^{3}H à partir de la glycine et du formiate-^{3}H

2 - Dégradation de la L-sérine-3-^{3}H en éthanol-1-^{3}H

3 - Détermination de la configuration absolue de l'éthanol-1-^{3}H

1 - PREPARATION DE LA L-SERINE-3-^{3}H

Nous avons préparé de la L-sérine-3-^{3}H à partir de la glycine et du formiate-^{3}H, au moyen d'incubations de tranches de foie de rat (10, 34, 35). L'obtention de quatre lots de L-sérine suffisamment marquée a nécessité sept incubations.

Résultats :

	Sér.I	Sér.II	Sér.III	Sér.IV
mg*	500	620	560	520
cpm**	1840	3600	4280	2656

* : après recristallisation à radioactivité constante

** : voir les conditions de comptage, pages : 20 et 56.
cpm = coups par minute pour 10 µM , déduction faite du bruit de fond. (la sérine n'est soluble dans le milieu scintillant qu'en présence d'eau et donne un rendement de comptage inférieur à celui des produits solubles).

Remarque : Les rendements d'incorporation varient entre 0,25 et 1,1 % et approchent ceux décrits pour l'incorporation du formiate marqué au ^{14}C (35).

2 - DEGRADATION DE LA L-SERINE-3-^{3}H EN ETHANOL-1-^{3}H

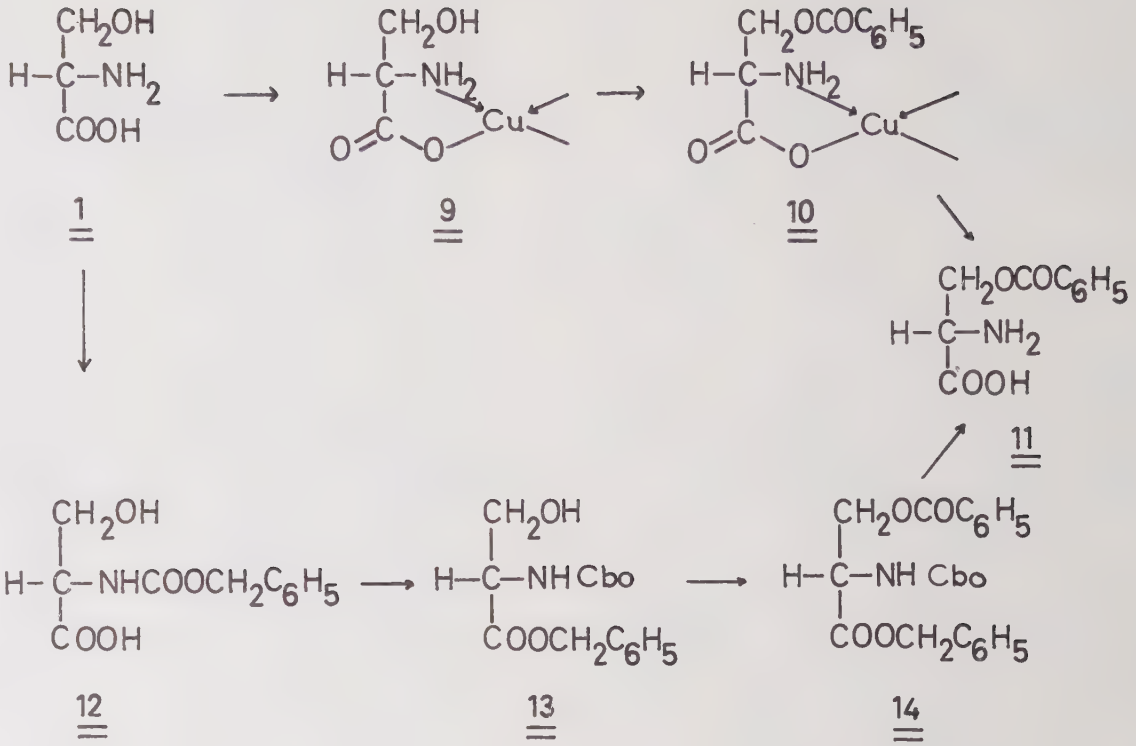
La dégradation de la sérine en éthanol devait obéir à un impératif majeur : ne pas risquer de modifier la stéréochimie de l'hydroxyméthyle. En conséquence, nous avons choisi des réactions et des conditions expérimentales qui offraient, a priori, le maximum de garanties

La première partie de la dégradation consistait à couper la chaîne entre les carbones 1et 2.Pour cela, nous devions protéger la fonction alcool de la sérine, ce qui a été réalisé par O-benzoylation.

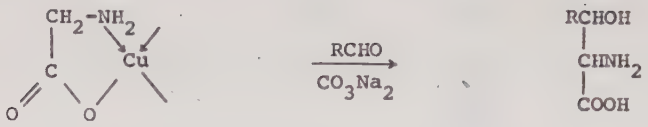
A/ PREPARATION DE L'O-BENZOYL-L-SERINE

a) Nous avons engagé les fonctions amine et acide de la sérine dans un complexe cuivrique 9 , puis nous avons benzoylé l'hydroxyle (9 → 10) par une réaction de Schotten-Baumann (36,37) ; finalement, nous avons isolé l'O-benzoyl-L-sérine 11 après décomposition du complexe.

Cette méthode présentait cependant certains dangers de racémisation. En effet, on a décrit la synthèse d'acides α-aminés β-hydroxylés


CH2OH
H–C–NH2
COOH
1
CH2OH
H–C–NH2
C
O
O
Cu
9
CH2OCOC6H5
H–C–NH2
C
O
O
Cu
10
CH2OCOC6H5
H–C–NH2
COOH
11
CH2OH
H–C–NHCOOCH2C6H5
COOH
12
CH2OH
H–C–NHCbo
COOCH2C6H5
13
CH2OCOC6H5
H–C–NHCbo
COOCH2C6H5
14

suivante (38) :

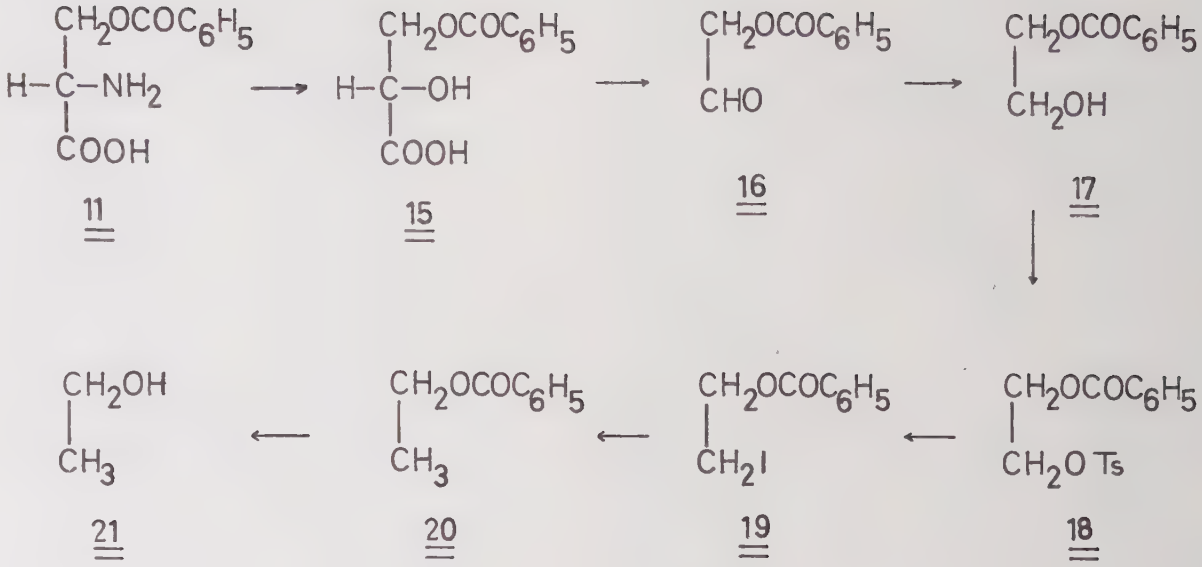


et l'on pourrait craindre la réversibilité au moins partielle de cette réaction en milieu alcalin. Nous avons trouvé que le complexe de cuivre de la sérine, traité par du carbonate de sodium, était effectivement décomposé en un mélange de sérine et de glycine. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de glycine lors de la benzoylation du complexe de cuivre de la sérine. Mais ce résultat n'excluait pas une autre possibilité : celle d'un équilibre, faisant intervenir la grande labilité de l'hydrogène α :

b) Afin d'écarter toute ambigüité, nous avons abandonné cette méthode au profit de groupes protecteurs bien connus dans la synthèse des peptides. La préparation des produits 12 et 13 a été décrite dans le cas de la sérine (39-41). Mais nous avons préféré l'ester benzylique à un ester p-nitrobenzylique (dans ce dernier cas, l'hydrogénolyse libère de la p-toluidine qu'il nous a été difficile de séparer de l'O-benzoyl-L-sérine). Le benzoate 18 se prépare facilement par action du chlorure de benzoyle, dans l'acétate d'éthyle, en présence d'une quantité stoechiométrique de triéthylamine. Finalement, après l'hydrogénolyse des groupes protecteurs des fonctions amine et acide, on isole l'O-benzoyl-L-sérine 11.

B/ DEGRADATION DE L'O-BENZOYL-L-SERINE EN ETHANOL

Les acides α-hydroxylés se prêtent mieux à la coupure que les acides α-aminés (42,43) : nous avons donc désaminé l'O-benzoyl-L-sérine (11 → 15). Sans isoler l'hydroxyacide 15 formé, nous l'avons coupé par


CH2OCOC6H5
H–C–NH2
COOH
11
CH2OCOC6H5
H–C–OH
COOH
15
CH2OCOC6H5
CHO
16
CH2OCOC6H5
CH2OH
17
CH2OCOC6H5
CH2O Ts
18
CH2OCOC6H5
CH2I
19
CH2OCOC6H5
CH3
20
CH2OH
CH3
21

le tétracétate de plomb dans du dioxanne. Il est intéressant de noter que cette réaction est notablement accélérée par la présence d'un peu d'eau, ce qui, pour l'instant, reste une observation sans explication (44,45). Le dosage de l'excès de Pb(IV) par iodométrie (46,47) montre que la quantité théorique de réactif a été consommée ; ce résultat exclut, lors de la désamination, la participation du benzoyle qui donnerait de l'acide glycérique-2-benzoate, inerte au tétracétate de plomb. On sait que la désamination nitreuse des acides α-aminés se fait avec rétention de configuration (48). L'aldéhyde 16 est immédiatement réduit par du borohydrure de sodium ; nous avons maintenu le pH du milieu réactionnel inférieur à 8 afin d'éviter une énolisation notable qui échangerait les hydrogènes en α entraînant une perte de radioactivité et une racémisation. L'alcool résultant 17 est isolé par chromatoplaque préparative et purifié par micro-distillation. Pour transformer l'hydroxyméthyle en méthyle, nous avons suivi une méthode décrite par Lemieux (31), qui consiste à transformer l'alcool en tosylate (17 → 18), puis à faire réagir ce dernier avec de l'iodure de sodium en milieu aprotique (acétone). L'iodure 19 est ensuite hydrogénolysé dans du méthanol en présence d'un léger excès de diéthylamine pour donner le benzoate d'éthyle 20. Celui-ci est saponifié par une solution aqueuse de potasse et donne, après lyophilisation, une solution aqueuse d'éthanol 21.

C/ CONTROLE DE LA DEGRADATION

a) Afin de vérifier qu'au cours de la coupure et de la réduction (15 → 17), il n'y avait pas eu d'énolisation, nous avons effectué les réactions dans l'eau lourde à partir de L-sérine non marquée. Les spectres de RMN des produits 17 et 18 montrent qu'il n'y a pas eu échange des hydrogènes en α, dans la limite de précision de l'appareil (≃ 5 %). Le spectre de masse du dibenzoate de l'éthylèneglycol correspondant confirme ce résultat.

b) Afin d'écarter l'éventualité d'une participation du groupe benzoyle lors de la préparation de l'iodure, nous avons oxydé une partie de l'éthanol marqué ainsi obtenu, suivant la méthode de Kuhn-Roth. Nous n'avons pas décelé de radioactivité dans l'acide acétique formé. Le groupe méthyle n'a donc pour origine que C-2 de la sérine. (On a montré, d'autre part, que l'oxydation de l'éthanol-2-^{3}H en acide acétique par l'an-

hydride chromique n'échangeait pratiquement pas le tritium (49).

c) Nous avons aussi vérifié qu'au cours de l'hydrogénolyse de l'iodure 19,il n'y a pas échange des hydrogènes en 1. Pour cela, nous avons répété la réaction dans les mêmes conditions, mais en utilisant CH_3OD (50) et du deutérium gazeux. Le spectre de RMN du benzoate d'éthyle formé montre qu'il n'y a eu aucun échange en 1, à la précision près de la méthode (environ 5 %).

Conclusion : la dégradation de la sérine en éthanol se fait donc avec un minimum de racémisation, inférieure en tout cas à la limite d'erreur de nos mesures (≃ 10 %).

D/ RESULTATS

Dégradation :	I		II		III		IV	
	mg	cpm	mg	cpm	mg	cpm	mg	cpm
Dérivé 14	-	-	-	-	1665	4380	1610	2771
O-benzoyl-L-sérine,HCl 11	600	2020	720	4820	660	4333	773	2804
Tosylate 18	130	1930	95	4670	246	4348	327	3100
Tosylate après dilution	258	981	280	1660	296	3470	-	-

cpm : coups par minute pour 10 µ M , déduction faite du bruit de fond.

3 - DETERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE DE L'ETHANOL-1-^{3}H

a) Pour déterminer la configuration absolue de l'éthanol-1-^{3}H obtenu par dégradation,nous avons suivi la méthode décrite par Arigoni et coll. (32), et Vennesland et coll.(51-53). Nous avons oxydé l'éthanol en acétaldéhyde par l'alcool-déshydrogénase de levure et isolé l'aldéhyde sous forme de dérivé de la dimédone (54). A ce sujet, il est

utile de noter que ce dérivé présente un minimum de solubilité dans l'eau à pH 4 (55). Nous avons couplé la réaction d'oxydation avec la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique par le lactate-déshydrogénase ; ainsi, l'hydrogène transféré de l'éthanol devient l'hydrogène α de l'acide lactique. Nous avons isolé l'acide lactique sous forme d'ester de p-phénylphénacyle.

Résultats :

	I		II		III		IV	
Dérivé de	mg	cpm	mg	cpm	mg	cpm	mg	cpm
- l'acétaldéhyde	4	590	8	1060	11,5	2250	6	1651
- l'acide lactique	-	-	0,91	180	2,5	570	6	614

cpm : coups par minute pour 10 µM, déduction faite du bruit de fond.

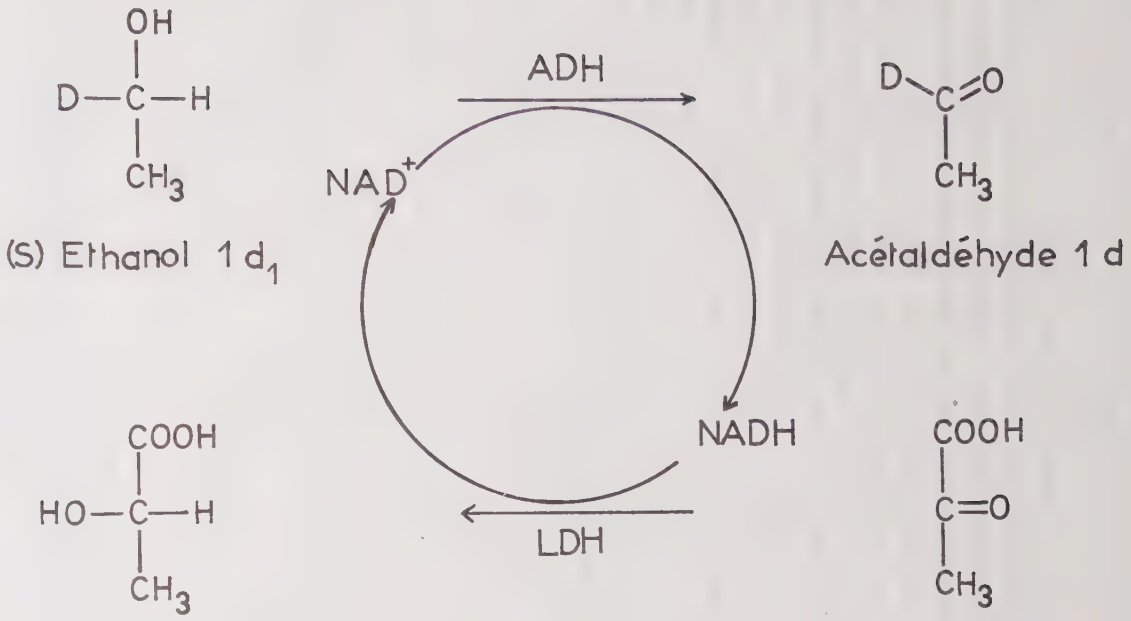
Si nous exprimons les valeurs ci-dessus en pourcentages d'activités spécifiques par rapport au tosylate, nous trouvons :

Dérivé de	I	II	III	IV
- l'acétaldéhyde	61	64	65	54
- l'acide lactique	-	11	17	20
Activité retrouvée :	-	75 %	82 %	74 %

Remarque :

Pour connaître l'activité de nos échantillons radioactifs, nous avons utilisé la méthode de comptage par scintillation liquide. Dans le liquide de scintillation, la radiation provenant de l'échantillon radioactif provoque l'excitation des molécules de solvant. Cette énergie d'excitation est transférée à la molécule solutée de scintillateur. Le scintillateur excité se désexcite par fluorescence, c'est-à-dire par émissions de photons qui sont comptés. Cependant, en présence de "répresseurs" * , les molécules de celui-ci peuvent être excitées ; ultérieurement, elles retombent à l'état fondamental sans émettre de photons, mais en fournissant de l'énergie cinétique. Le rendement de comptage est donc diminué par la présence de répresseurs. Nous avons vérifié que, aux concentrations utilisées lors du comptage ($\leq$ 10 µM), nous n'avons

* en anglais : quenchers, quenching



H. Weber J.Seibl D.Arigoni

pas eu de phénomène de répression dû aux molécules comptées (nous décrivons la méthode utilisée p. 44). Il en découle que les activités trouvées peuvent être comparées entre elles.

b) Etude des effets isotopiques dûs au tritium :

Dans le dernier tableau, nous constatons que la radioactivité retrouvée est inférieure à 100 %. Cet écart nous a incité à étudier l'influence du tritium sur les réactions enzymatiques utilisées pour déterminer la configuration absolue de l'éthanol-1-^{3}H. Les travaux d'Arigoni et coll. ont porté sur de l'éthanol mono-deutérié pratiquement à 100 % ; dans notre cas, par suite de la forte dilution isotopique, nous sommes en présence de réactions compétitives et devons tenir compte d'effets isotopiques différents. Pour estimer la pureté optique de l'éthanol-1-^{3}H obtenu par dégradation, il nous fallait être en mesure de comparer les résultats ci-dessus à ceux trouvés à partir d'éthanol "racémique" *. Nous avons préparé les phényluréthanes à partir d'éthanol-1-^{3}H "racémique" et de (S)-éthanol-1-^{3}H stéréochimiquement pur. Ceci nous permet de connaître, avec exactitude, la radioactivité de l'éthanol régénéré par saponification. Nous avons ensuite répété avec ces éthanols les réactions enzymatiques dans les mêmes conditions expérimentales que ci-dessus.

Résultats :

	Ethanol-1-^{3}H racémique	(S)-Ethanol-1-^{3}H
Dérivé de		
- l'acétaldéhyde	43,5 %	90 %
- l'acide lactique	30 %	0,0 %
Total :	73,5 %	90 %

% de radioactivité spécifique par rapport à l'éthanol de départ.

---

* Ethanol racémique :

$$\langle\!\langle \text{(S)-éthanol-1-}^3\underline{\text{H}} \rangle\!\rangle = \langle\!\langle \text{(R)-éthanol-1-}^3\underline{\text{H}} \rangle\!\rangle \ll \langle\!\langle \underline{\text{éthanol}} \rangle\!\rangle$$

On constate que les résultats diffèrent de la valeur théorique (50 % et 100 % respectivement) : faiblement dans le cas de l'acétaldéhyde et notablement pour l'acide lactique. Nous verrons dans le chapitre III l'origine de ces effets isotopiques.

Conclusion :

Dans le cas de H_S, l'hydrogène non transféré, on doit tenir compte d'un facteur de correction de 1,11. Dans le cas de H_R, l'hydrogène transféré de l'éthanol sur le NAD, puis sur l'acide pyruvique, on peut admettre un facteur de correction égal à 1,65.

c) Nos résultats deviennent ainsi, en tenant compte des effets isotopiques :

	I	II	III	IV
Dérivé de				
- l'acétaldéhyde	68	71	72	60
- l'acide lactique	-	18	28	33
Total :	-	89	100	93
Pureté optique de l'éthanol-1-^{3}H obtenu par dégradation (en %)	36	42	44	20

Remarque :

Au cours de la dégradation IV, nous avons eu des difficultés pour contrôler le pH de la réduction de l'aldéhyde 16 en alcool 17. Ceci peut expliquer, dans ce cas, la perte plus importante de pureté optique.

4 - CONCLUSION

L'hydrogène provenant du formiate a, d'une manière prépondérante, la configuration S dans l'hydroxyméthyle de la L-sérine.

(La pureté optique en C-3 de la sérine est de l'ordre de 40 %).

La dégradation chimique, comme nous l'avons vu plus haut, racémise à moins de 10 %, limite supérieure de nos mesures. La perte de pureté optique de 60 % est donc due en grande partie (au moins 50 %) au mécanisme même des réactions de synthèse de la L-sérine.

C H A P I T R E II

DEROULEMENT STEREOCHIMIQUE DE LA BIOSYNTHESE DE LA L-SERINE

1 - DISCUSSION

Les résultats décrits dans le chapitre I montrent l'existence d'une induction asymétrique de l'ordre de 40 %. Le caractère partiel de la stéréospécificité observée n'indique cependant pas nécessairement un manque de stéréospécificité des réactions enzymatiques étudiées, car il a pu se produire une racémisation lors d'étapes non-enzymatiques. Examinons quels sont les facteurs qui peuvent influencer la stéréochimie de ces réactions.

a) Réduction du méthényl en méthylène H_4-folate :

Les déshydrogénases faisant intervenir le NAD^+ (ou $NADP^+$) sont connues pour être stéréospécifiques vis-à-vis de leurs substrats (alcool-déshydrogénases etc..(57)). Les seules exceptions ont été décrites par Mosher et coll. (58) : des cétones sont réduites, dans une levure en fermentation, en alcools correspondants avec une stéréosélectivité variant de 12 à 92 %. Cependant, un des résultats décrits par Mosher ((+)-2-butanol) a été infirmé : une stéréosélectivité totale a été observée par des auteurs travaillant avec l'alcool-déshydrogénase pure (extraite de la levure) (59). Il est probable que, dans le cas de la levure en fermentation, interviennent des systèmes enzymatiques distincts, de déroulement stéréochimique inverse (60a). En effet, il n'est pas exclu qu'une même cétone puisse servir de substrat à deux enzymes différentes. Une pareille hypothèse n'est donc pas totalement exclue dans notre cas . Cependant, rappelons que ces résultats constituent une exception et il est raisonnable d'admettre que la réduction du groupe méthényle en méthylène est bien stéréospécifique par rapport au substrat.

b) Dissociation du 5,10-méthylène-H_4-folate :

Il est bien connu que le méthylènetétrahydrofolate est en équilibre avec sa forme dissociée (25,26,61-63a, 63b).

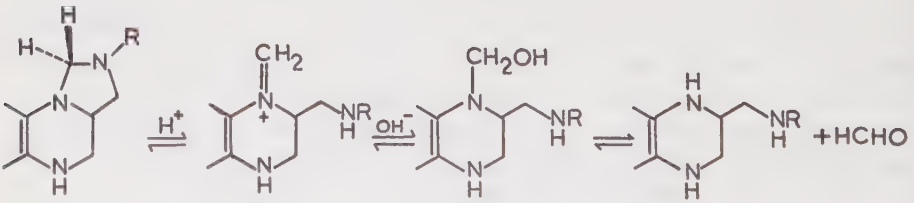
$$5,10\text{-}CH_2\text{-}H_4\text{folate} + H_2O \rightleftharpoons H_4\text{folate} + HCHO$$

La constante de dissociation varie, selon les auteurs, entre 10^{-3} et 10^{-4}. La stabilité du méthylène dépend beaucoup du pH ; mais il n'existe aucune étude cinétique de cette dissociation. Kisliuk a montré que la transhydroxyméthylation se fait avec le formaldéhyde lié au coenzyme (25). Lorsqu'on incube du 5,10-$^{14}CH_2$-H_4folate avec du formaldéhyde non marqué, on constate que l'aldéhyde libre devient radioactif (25). D'autre part, lorsqu'on incube du 5,10-$^{14}CH_2$-(±)-H_4folate dans un système qui synthétise de la L-sérine, on constate que l'activité retrouvée dans la L-sérine est de 63 à 80 % de l'activité du méthylène ; or, seule la forme (-) est biologiquement active et l'on ne devrait atteindre que 50 % (25). Ce résultat implique la possibilité d'un équilibre non-enzymatique :

$$5,10\text{-}^{14}CH_2\text{-}(+)\text{-}H_4\text{folate} + (-)\text{-}H_4\text{folate} \rightleftharpoons (+)\text{-}H_4\text{folate} + 5,10\text{-}^{14}CH_2\text{-}(-)\text{-}H_4\text{ folate}$$

Ceci démontre amplement la dissociation du 5,10 méthylènetétrahydrofolate au cours de la transhydroxyméthylation. Cette dissociation entraîne

Dissociation :

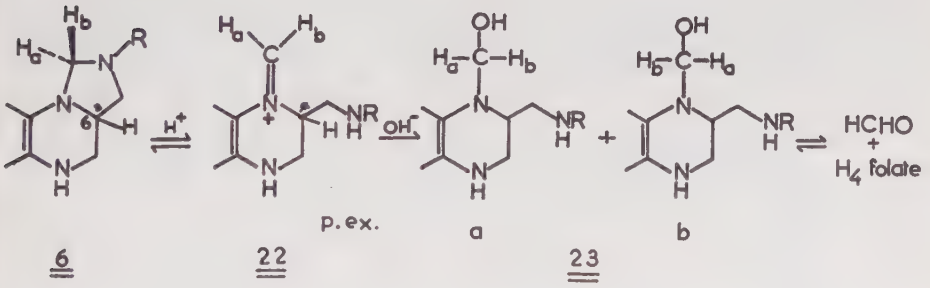


6 22 23 3

évidemment l'équivalence des deux hydrogènes du pont méthylénique dans le méthylènetétrahydrofolate formé par recombinaison, d'où une racémisation, et après la transhydroxyméthylation, l'équivalence des deux hydrogènes de l'hydroxyméthyle de la L-sérine formée. On peut également imaginer qu'une des étapes réversibles pouvant mener à la dissociation, la formation de l'hydroxyméthyltétrahydrofolate 23, ne se fasse que de façon partiellement stéréospécifique.

Remarque :

L'induction asymétrique observée dans la synthèse de la L-sérine pourrait être attribuée à la présence d'un centre asymétrique en C-6 de l'acide tétrahydrofolique. Ainsi l'attaque de l'ion immonium 22 par $OH^{\ominus}$ pourrait se faire préférentiellement sur une face de la molécule. ($\nearrow$23a$\swarrow$ ≠ $\nearrow$23b$\swarrow$). Cependant, cela impliquerait que l'hydroxyméthyltétrahydrofolate soit la forme active du coenzyme qui se fixerait



6 22 23

sur l'enzyme lors de la transhydroxyméthylation, alors que tout semble indiquer que c'est en réalité le méthylènetétrahydrofolate.

c) Conclusion :

Nous pensons que la réduction du méthényle en méthylènetétrahydrofolate et la transhydroxyméthylation, sont toutes deux des réactions enzymatiques stéréospécifiques. Dans la synthèse de la L-sérine à partir de la glycine et du formiate, dans le foie du rat, l'hydrogène provenant du formiate a la configuration S dans l'hydroxyméthyle de la L-sérine. L'absence de stéréospécificité totale est sans doute due à la

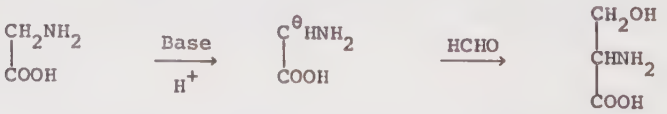
compétition entre la réaction de transhydroxyméthylation et la dissociation non enzymatique du méthylènetétrahydrofolate, cette dernière n'étant pas assez importante pour supprimer toute stéréosélectivité, mais suffisante pour la réduire de façon appréciable.

Nous proposons donc le schéma ci-contre pour expliquer nos résultats.

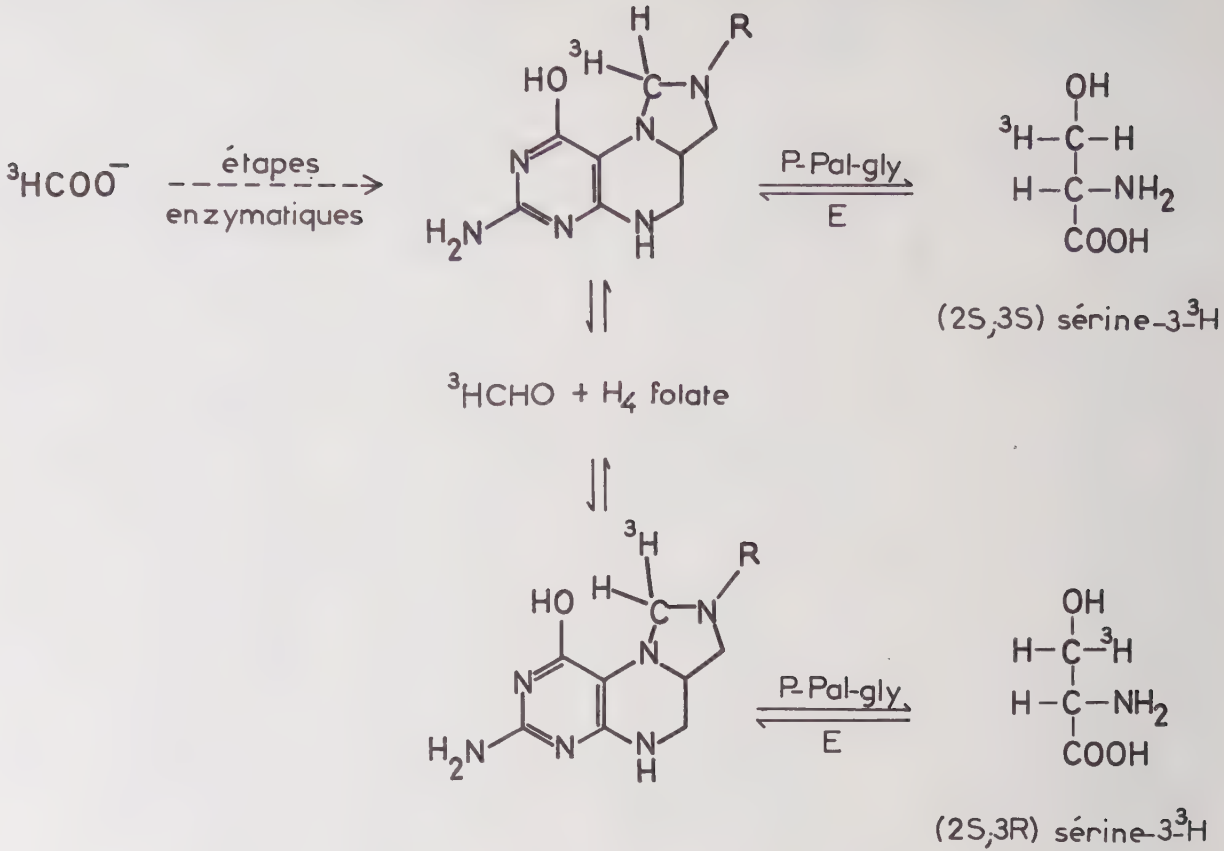
2 - MECANISME DE LA TRANSHYDROXYMETHYLATION

Nous allons, dans ce paragraphe, analyser le mécanisme possible de la transhydroxyméthylation. Nous procèderons par analogie avec des réactions connues en chimie organique et en biochimie. Ce faisant, nous désirons étayer la conclusion de notre travail et montrer dans quelle mesure notre résultat permet une meilleure connaissance du déroulement stéréochimique de la transhydroxyméthylation ; d'autre part, nous désirons déboucher sur ce qui peut constituer un prolongement à ce travail.

La synthèse de la sérine à partir de la glycine et de formaldéhyde est une réaction du type de l'aldolisation :

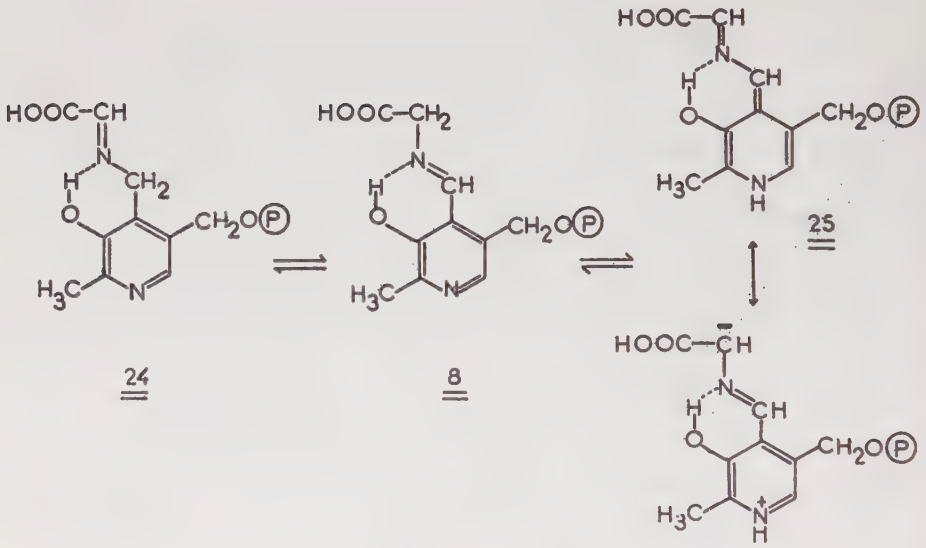


Le carbone 2 de la glycine doit être transformé en carbanion (réactif nucléophile), lequel attaquera le carbonyle du formaldéhyde (réactif électrophile). La réaction ci-dessus n'est concevable <u>in vitro</u> qu'en milieu fortement basique, et sur un ester ou autre dérivé dissimulant la fonction acide. Nous expliquerons d'abord comment les coenzymes (P-Pal , H_4folate) activent leurs substrats (glycine, formaldéhyde), afin de rendre cette réaction possible dans les conditions physiologiques; puis nous décrirons des schémas de réactions pouvant mener à la sérine.


$^3HCOO^-$
étapes
enzymatiques
P-Pal-gly
E
$^3HCHO + H_4$ folate
P-Pal-gly
E
(2S;3S) sérine-3-^3H
(2S;3R) sérine-3-^3H

A/ ACTIVATION DE LA GLYCINE :

La glycine est activée par le phosphate de pyridoxal, en donnant avec ce coenzyme une base de Schiff 8 (28a, 29) qui peut donner lieu, a priori, à deux tautomeries : tautomérie des imines (8 ⇌ 24), et tautomérie imine-énamine (8 ⇌ 25). Les hydrogènes α de la glycine deviennent labiles et sont échangeables (29).

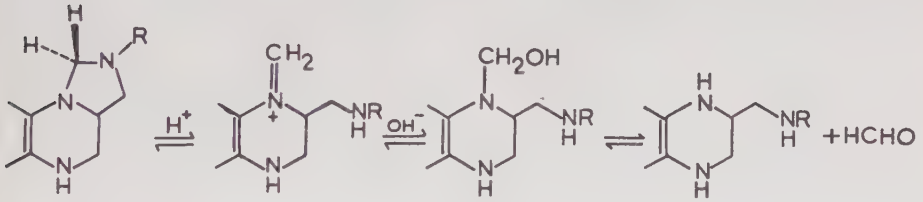


Conclusion :

Le phosphate de pyridoxal active la glycine en rendant C-2 nucléophile. L'espèce réactive sera 25 (5, 60b, 64-66). On retrouve ici la réactivité des énamines, réactifs nucléophiles, utilisées en synthèse organique pour activer la position α d'un carbonyle (67a).

B/ ACTIVATION DU FORMALDEHYDE :

Le formaldéhyde est activé par l'acide tétrahydrofolique. Il donne spontanément avec ce coenzyme le 5,10-méthylènetétrahydrofolate 6. Kisliuk (25) a montré que la transhydroxyméthylation implique une forme liée du formaldéhyde : l'acide tétrahydrofolique n'est pas uniquement un transporteur, mais il possède un rôle chimique, celui de rendre le carbone du formaldéhyde plus électrophile. Nous avons représenté trois formes du formaldéhyde lié, susceptibles de réagir avec la glycine activée :



6 22 23 3

1°- 5,10-méthylènetétrahydrofolate 6 :

Le 5,10-méthylènetétrahydrofolate est une méthylène-bis-amine. On sait que les méthylène-bis-amines réagissent exceptionnellement en tant que telles (68,69) ; par contre, elles se dissocient facilement en présence d'acide pour donner l'imine ou l'immonium correspondant. Les gem-diamines conduisent essentiellement aux types de réactions des imines dont elles dérivent (70a). Par exemple, les méthylène-bis-amines sont utilisées dans des condensations de Mannich (71). Il semble donc raisonnable de penser que 6 n'est pas l'intermédiaire électrophile. Ceci est corroboré par les observations qui suivent. La transhydroxyméthylation n'a plus lieu à pH 9,5 ; les auteurs (28a) attribuent ce résultat à la stabilité particulière du méthylènetétrahydrofolate à ce pH.* La transhydroxyméthylation semble donc liée à la dissociation du méthylènetétrahydrofolate ; cette dissociation a été amplement démontrée dans la zone de pH où réagit la transhydroxyméthylase.

* Il n'est d'ailleurs pas exclu qu'à ce pH on ait aussi modifié le site actif de l'enzyme.

2° - Hydroxyméthyltétrahydrofolate 23 :

Le pont méthylénique, en s'ouvrant, donne l'ion immonium 22 qui peut fixer $OH^{\ominus}$ pour former la carbinolamine 23. Les carbinolamines sont habituellement instables et se déshydratent facilement ; en fait, leurs réactions avec des nucléophiles passent par l'intermédiaire des ions immonium dont elles dérivent. (Réactions d'élimination-addition) (27, 70b, 71, 72).

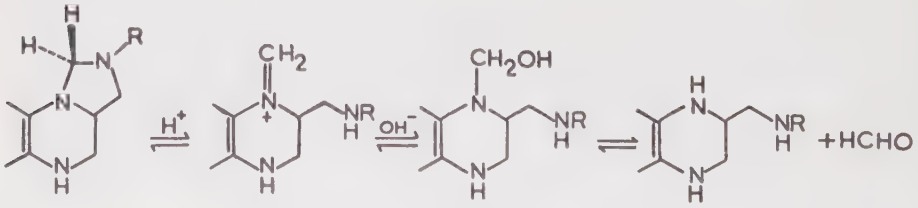
3° - Ion-immonium 22 :

L'ion immonium est l'espèce réactive des méthylène-bis-amines et des carbinolamines (73) ; en effet, les ions immonium sont des réactifs très électrophiles et, grâce à cette propriété, ils interviennent dans un grand nombre de réactions de synthèse (Mannich, Knoevenagel, etc.) Il est bien connu que beaucoup de réactions faisant intervenir une attaque nucléophile sur un carbonyle, sont activées lorsque le carbonyle est d'abord transformé en ion immonium (72b, 67b).

Conclusion : Nous pensons que l'ion immonium 22 est la forme réactive du formaldéhyde dans la transhydroxyméthylation (6, 60a, 65b). L'ion immonium 22 pourra réagir avec la glycine activée 25, sans nouvel apport d'énergie (14).

4° - Direction de l'ouverture du pont méthylénique :

Jencks a étudié le mécanisme de la synthèse du 5,10-méthylènetétrahydrofolate à partir de l'acide tétrahydrofolique et de formaldéhyde (27). Il a proposé la séquence suivante (de gauche à droite) :

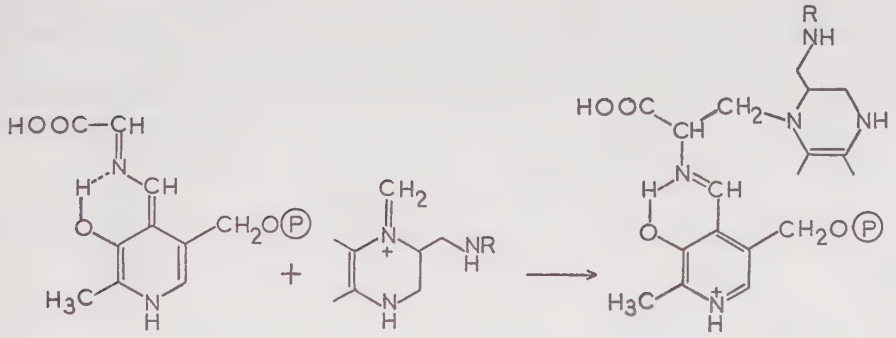


6 22 23 3

l'azote 5, le plus basique, réagit avec le formaldéhyde (N_5 : $pK'_a = 4,8$; N_{10} : $pK'_a = -1,25$ (74)). Cette étude confirme des résultats trouvés antérieurement par Blakley (63a). Les arguments de basicité sont en faveur de l'ion immonium en 5 (le plus stable thermodynamiquement). Cependant, on ne peut pas exclure que l'ion immonium en 10 soit la forme active.(La réduction de 6 par le borohydrure, à pH 7, conduit à un mélange de 5 et 10 méthyltétrahydrofolate (75,76) : les deux ions immonium existent donc, et sont mis en évidence lorsqu'on a un contrôle cinétique). La réduction enzymatique du 5,10-méthylènetétrahydrofolate mène au 5-méthyltétrahydrofolate (14). Il semble donc raisonnable de penser que l'ouverture du pont méthylénique conduit à l'ion immonium en 5 et que celui-ci est la forme réactive du formaldéhyde.

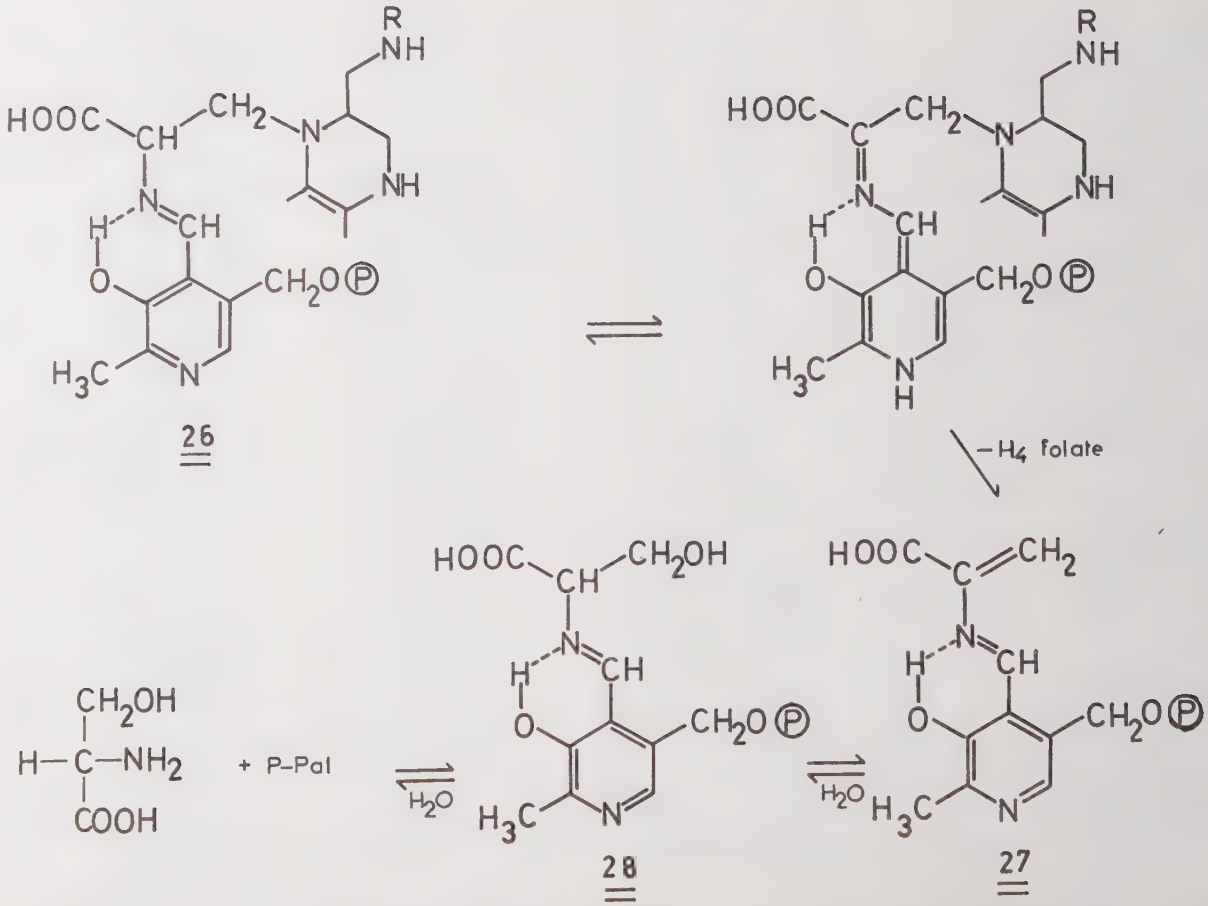
C/ SYNTHESE DE LA L-SERINE :

Nous avons représenté ci-dessous l'addition de la glycine activée 25 sur l'ion immonium 22 ; l'intermédiaire 26 obtenu est une base



25 22 26

de Mannich. Pour passer de 26 à la sérine deux voies sont possibles : une substitution nucléophile par $OH^{\ominus}$, ou une réaction d'élimination (rétro-Michaël) puis addition de H_2O, et toutes deux suivies d'une hydrolyse libérant la sérine du phosphate de pyridoxal.

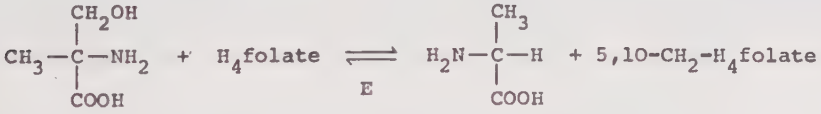

HOOC
CH
CH2
N
R
NH
NH
H
O
CH2O Ⓟ
H3C
N
26
⇌
HOOC
C
CH2
N
R
NH
NH
H
O
CH2O Ⓟ
H3C
N
H
– H4 folate
CH2OH
H—C—NH2
COOH
+ P-Pal
H2O
HOOC
CH
CH2OH
N
H
O
CH2O Ⓟ
H3C
N
28
H2O
HOOC
C
CH2
N
H
O
CH2O Ⓟ
H3C
N
27

1° - L'élimination-addition : voir le schéma ci-contre.

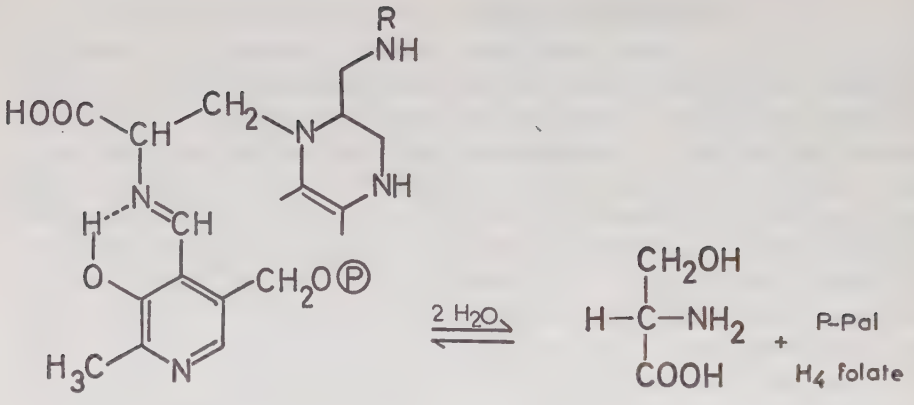
Ce schéma rentre dans le cadre habituel de la chimie de synthèse; ainsi, les β-amino-cétones sont des précurseurs des plus utiles dans les réactions de Michaël : elles se décomposent facilement pour donner les cétones α,β-éthyléniques correspondantes, qui subissent une addition de Michaël avec un nucléophile (67c). Cette propriété s'étend aux composés qui possèdent un H mobile en β de l'amine (71) (c'est le principe même de la réaction de Knoevenagel, où l'on s'arrête au niveau du produit insaturé (67b, 77 ; gramine (78)). Dans 26, l'H en β de l'azote est labile à cause du phosphate de pyridoxal, et l'on peut imaginer une élimination (→ 27) suivie d'une addition d'eau (→ 28). Cette voie est très favorisée du point de vue thermodynamique ; par ailleurs, elle rencontre des analogies en biochimie ; les réactions catalysées par les enzymes suivantes : sérine déshydrase (79), tryptophanase (80) tryptophane synthétase (81) passent par l'intermédiaire commun 27.

2° - Substitution :

On voit que le schéma précédent est possible grâce à la présence d'un H mobile en β de l'azote. Or il semble que la même enzyme (L-sérine transhydroxyméthylase) donne aussi une réaction de transhydroxyméthylation avec l'α-méthylsérine (28b), cas où l'élimination n'est plus possible :



Nous devons donc admettre une réaction de substitution par $OH^{\ominus}$ sur 26 avec départ d'H_4folate, suivie d'une hydrolyse qui libère le phosphate de pyridoxal. Cette séquence serait également valable dans le cas de la L-sérine.



26

Des réactions analogues ont été décrites par Snell et coll. (3) dans le cas d'une enzyme extraite de bactéries, distincte de la précédente, qui conduit à des réactions de transhydroxyméthylation avec l' α-hydroxyméthylsérine, l' α-méthylsérine, etc... A priori, cette réaction de substitution semble difficile du point de vue thermodynamique (énergie d'activation élevée) ; cependant,elle pourrait être facilitée par la présence d'un substituant aromatique sur l'azote (82) et par la nature du site actif de l'enzyme. De tels cas sont connus en chimie organique (82,70c)

3° - Conclusion :

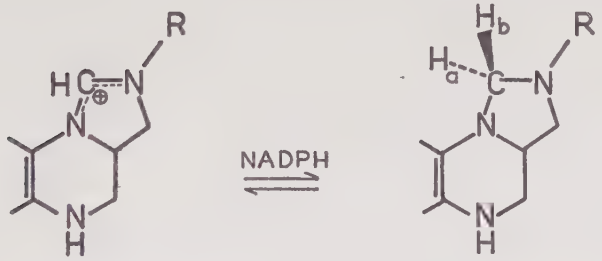
Dans le cas de la synthèse de la L-sérine,nous ne pouvons pas décider entre les deux schémas exposés ci-dessus. Cependant, ceux-ci sont distinguables : en effet, au cours de l'élimination-addition, les deux hydrogènes α de la glycine sont totalement échangés ; par contre,dans le mécanisme de la substitution, un seul est échangé. On devra préparer de la L-sérine à partir de glycine-2-^{3}H et voir si les hydrogènes α sont échangés ou non :

Ceci peut consituter une suite à notre travail.

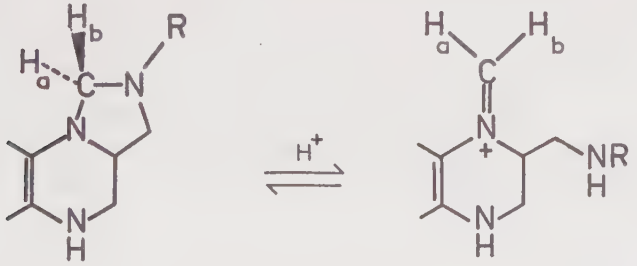
D/ DEROULEMENT STEREOCHIMIQUE DE LA TRANSHYDROXYMETHYLATION

Nous allons reprendre la conclusion du paragraphe 1 de ce chapitre en précisant les implications stéréochimiques de notre résultat (page 23) dans le mécanisme de la transhydroxyméthylation.

1° - La réduction du méthényle en méthylènetétrahydrofolate est stéréospécifique ; les deux hydrogènes Ha et Hb du pont méthylénique ont une origine différente : l'un provenant du formiate, l'autre du NADPH.



2° - L'ouverture du pont méthylénique conduit à l'ion immonium 22 (probablement en 5). Cette ouverture doit être stéréospécifique (le doublet de l'azote en trans par rapport à la liaison C-N qui sera rompue) pour maintenir la distinction entre Ha et Hb.



p.ex.

Cette condition peut être remplie grâce au fort caractère de double liaison de la liaison $>C=\overset{+}{N}<$ dans l'ion immonium (83), donc à l'empêchement à la rotation de la liaison carbone-azote.

3° - La formation de l'intermédiaire 26 doit être stéréospécifique : pour cela, il faut que la glycine activée 25 s'additionne toujours sur la même face de l'ion immonium (dessin page 35).

4° - Le passage de l'intermédiaire 26 à la L-sérine (soit par élimination-addition, soit par substitution) doit être stéréospécifique L'hydrogène provenant du formiate aura la configuration S dans l'hydroxyméthyle de la L-sérine.

C H A P I T R E III

ETUDE DES EFFETS ISOTOPIQUES SUR LA DETERMINATION ENZYMATIQUE DE LA CHIRALITE DE L'ETHANOL-1-^{3}H

Pour cette étude, nous avons utilisé de l'éthanol-1-^{3}H racémique; on peut considérer l'oxydation enzymatique de cet éthanol comme étant une juxtaposition de trois réactions :

$$CH_3\text{-}CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3\text{-}CHO + NADH + H^+ \qquad (a)$$

$$(S)\text{-}CH_3\text{-}C^3HHOH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3\text{-}C^3HO + NADH + H^+ \qquad (b)$$

$$(R)\text{-}CH_3\text{-}CH^3HOH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3\text{-}CHO + NAD^3H + H^+ \qquad (c)$$

où $\langle$ (R)-éthanol-1-^{3}H $\rangle$ = $\langle$ (S)-éthanol-1-^{3}H $\rangle \ll \langle$ éthanol $\rangle$

Dans une première partie, nous étudierons l'effet isotopique dû à ^3H_S , puis celui dû à ^3H_R dans l'oxydation (c) ainsi que dans la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique.

A/ EFFET ISOTOPIQUE DU A ^3H_S

Nous avons vu au cours du chapitre I que lorsqu'on oxyde de l'éthanol-1-^{3}H racémique par l'ADH, on ne trouve que 45 % environ de la radioactivité spécifique de l'éthanol de départ dans le dérivé de l'acétaldéhyde, au lieu des 50 % attendus. Cet écart par rapport à la valeur théorique nous a incité à déterminer l'origine de cet effet. A priori plusieurs hypothèses sont possibles : variation du rendement du comptage du tritium selon la nature de la molécule (represseur), effets isotopiques secondaires , cinétique ou thermodynamique,dans l'oxydation (b) , effet isotopique lors de la formation du dérivé de l'acétaldéhyde. Nous avons étudié l'oxydation enzymatique en faisant varier certains paramètres.

1) Résultats :

Les chiffres indiqués au cours de ce chapitre seront toujours des pourcentages de radioactivités spécifiques par rapport à l'éthanol de départ.

a - Répression :

A une solution de scintillateur contenant une source de tritium, nous avons ajouté des quantités croissantes de phényluréthane et de dimédonate d'acétaldéhyde non marqués. On trouve que dans nos concentrations ($\leq$ 10 µM), les rendements de comptage ne sont pas déprimés. Les activités spécifiques de ces deux molécules sont donc parfaitement comparables. Ce résultat a été confirmé par une détermination de la repression par standardisation externe (Packard-Tri-Carb 3375).

b - Influence du pH : durée de l'oxydation : 45 mn.

pH	10,5	9,0	8,6
Acétaldéhyde	43,5	42,5	45
Position de l'équilibre	26 %	16 %	7 %

Après 45 mn d'oxydation, la réaction (a) est équilibrée (mesures spectrophotométriques). La valeur du pH influe sur la position de l'équilibre et sur la vitesse de la réaction.

c - Influence de la durée de l'oxydation : à pH = 10,5 à 20°

t. mn.	15	30	45	60	90	105
acétaldéhyde	44	42,5	43,5	45	48,5	49,5

Notons qu'à pH 10,5 l'équilibre macroscopique (de la réaction (a), le seul mesurable) est atteint entre 30 et 45 mn. On constate que lorsqu'on prolonge suffisamment le temps de réaction, l'activité de l'aldéhyde tend vers 50 %, valeur attendue.

d - Influence de la concentration de la dimédone lors de la formation du dérivé :

Durée de l'oxydation en mn.	45	90	105
Equivalent de dimédone : 0,5	44		
0,8	46,5	48,5	
1,5	46	48	49,5

Remarque : 1 équivalent = 2 fois la concentration de l'aldéhyde, en dimédone.

2) Discussion :

Des auteurs ont noté un effet isotopique cinétique dû au tritium lors de la formation de phénylhydrazones (84) ($\frac{kH}{kT} < 1$ ou > 1 selon les cas) ; ils font la même remarque pour les dérivés de la dimédone ($\frac{kH}{kT} = 1,16$) sans donner de précisions expérimentales (85). Cependant, dans nos conditions de travail, cet effet reste faible, se confondant avec les erreurs de mesure. Si cet effet existe, il ne peut pas expliquer, dans notre cas, l'écart par rapport à 50 %.

Le résultat décisif nous est fourni par l'étude du rapport des activités spécifiques en fonction de la durée de l'oxydation. Lorsqu'on prolonge suffisamment les réactions (a) + (b) , l'activité de l'aldéhyde tend vers la valeur théorique. Ce résultat exclut la possibilité d'un effet isotopique secondaire thermodynamique décelable ; (a) et (b) n'atteignent pas l'équilibre simultanément : l'équilibre est atteint plus lentement pour les molécules tritiées. Nous sommes en présence d'un effet isotopique secondaire cinétique. Ceci est confirmé par l'observation suivante : dans des conditions identiques, pour un même temps de réaction, l'activité de l'acétaldéhyde est la plus élevée lorsque le pH est égal à 8,6, valeur pour laquelle la vitesse d'oxydation est la plus grande (86).

Les effets isotopiques de cette nature sont connus (87-91) , mais ils n'ont jamais été observés à notre connaissance dans cette réaction. L'effet observé est de première espèce (87) ; en effet, au cours de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde, la liaison C-isotope change

d'hybridation et subit une réorientation spatiale. Pour expliquer le ralentissement des réactions dans le cas des effets isotopiques secondaires de première espèce, Streitwieser propose une "inhibition isotopique" de la vibration hors du plan dans l'état de transition (92) *.

Si l'on extrapole la courbe : rapport des activités spécifiques = f (t) à l'origine des temps, on trouve une valeur indicative** (88, 93) égale à $\frac{kH}{kT}$ = 1,2. De la formule d'Arrhénius,on déduit la relation : $\Delta\Delta G^{\neq} = 2{,}3\ RT \log \frac{kH}{kT}$ où $\Delta G^{\neq}$ représente l'énergie d'activation. Dans notre cas, on trouve $\Delta\Delta G^{\neq}$ = 100 cal/mole, à 20°. La valeur $\frac{kH}{kT}$ = 1,2 représente uniquement un ordre de grandeur, en effet les mesures de radioactivités sont des moyennes arithmétiques ($\pm$ 2 %) et nous avons toujours opéré à température ambiante, sans thermostat. Mais l'effet observé est supérieur aux limites d'erreurs et ne fait pas de doute. Une étude cinétique plus précise exigerait des conditions d'expériences rigoureusement reproductibles (température, concentrations etc..) et un double marquage (^{14}C , ^{3}H), mais ce n'était pas là notre but.

3) Conclusion :

L'oxydation du (S)-éthanol-1-^{3}H par l'alcool-déshydrogénase de la levure, à 20°, est accompagnée d'un effet isotopique secondaire cinétique ($\frac{kH}{kT}$ = 1,2 ; $\Delta\Delta G^{\neq}$ = 100 cal/mole).

---

* lorsque la réaction est proche d'une SN_1 , l'effet isotopique secondaire cinétique est direct ($\frac{kH}{k\ isotope} > 1$) ; dans le cas d'une SN_2 , l'effet isotopique est toujours faible et quelquefois inverse (91,92).

** en toute rigueur il faudrait porter le rapport des activités en fonction de l'avancement de la réaction. Nous supposons ici que l'avancement de la réaction est une fonction linéaire du temps ; ceci est faux d'où l'approximation.

Remarques :

a - En toute rigueur, il aurait fallu tenir compte de l'effet isotopique sur l'hydratation de l'acétaldéhyde :

$$CH_3\text{-}CHO + H_2O \underset{}{\overset{k}{\rightleftharpoons}} CH_3\text{-}CH(OH)_2$$

On sait que cet effet est faible et inverse : $\frac{kH}{kD} = 0,98$ (94) (D sur le carbonyl). Cependant les vitesses de réaction ne sont pas comparables et dans la séquence :

$$CH_3\text{-}CH_2OH \longrightarrow CH_3CHO \longrightarrow CH_3\text{-}CH(OH)_2$$

l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde détermine la vitesse, l'hydratation de l'aldéhyde étant un phénomène extrêmement rapide (94,112,113). Dans ces conditons, il est raisonnable de négliger l'effet isotopique cinétique sur l'hydratation de l'acétaldéhyde.

b - Des études faites sur l'effet isotopique primaire cinétique dans le cas de l'oxydation (c) ont montré qu'à 20°, l'étape qui détermine la vitesse d'oxydation est celle du transfert de H_R de l'éthanol (91, 95). Ce transfert étant accompagné d'un changement d'hybridation de la liaison C-H_S , l'existence d'un effet isotopique secondaire cinétique est théoriquement possible. Notre résultat est donc en accord avec les travaux antérieurs.

c - Palm (95) a montré que l'effet isotopique cinétique primaire sur l'oxydation de l'éthanol-1-^{3}H varie en fonction de la température : variation faible entre 5° et 20°, augmentation au-delà de 20°; l'interprétation proposée est la suivante : pour t $\leqslant$ 20°, le transfert de l'hydrogène contrôle la vitesse (effet isotopique primaire), au-dessus de 20°, une autre réaction prend le pas : c'est la dissociation du coenzyme réduit NADH du complexe enzyme-NADH (effet isotopique secondaire) Cependant la valeur de ce dernier effet semble très élevée. En étudiant la variation de l'effet isotopique secondaire cinétique en fonction de la température, on pourrait préciser de façon plus certaine les réactions contrôlant la vitesse de l'oxydation de l'éthanol par l'ADH.

B/ EFFET ISOTOPIQUE DÛ A ^3H_R

Nous avons vu au cours du chapitre I que la déviation de l'activité du dérivé de l'acide lactique par rapport à la valeur théorique est importante. Ce fait est bien connu. En effet le transfert de ^2H_R ou de ^3H_R de l'éthanol sur le NAD^+ est accompagné d'un fort effet isotopique primaire cinétique (52,95-97). Ce même effet existe au cours de la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique avec NAD^3H (52,98) (nous arrêtons la réaction après transformation de 80 % de NADH).

$$CH_3CH^3H_ROH + NAD^+ \underset{E}{\rightleftharpoons} CH_3CHO + NAD^3H_R + H^+ \quad (c)$$

$$NAD^3H_R + \begin{matrix} COOH \\ | \\ C{=}O \\ | \\ CH_3 \end{matrix} + H^+ \underset{E}{\rightleftharpoons} \begin{matrix} COOH \\ | \\ OH{-}C{-}{}^3H \\ | \\ CH_3 \end{matrix} + NAD^+ \quad (d)$$

Les deux effets sont additifs. Ceci est confirmé par nos résultats : à une augmentation de la durée de l'oxydation (c), correspond, pour un même temps de réduction (d) (35 mn), un gain d'activité pour l'acide lactique.

Dérivé de l'oxydation (c) mn.	45	60
Acide lactique	30	35.

Conclusion :

L'effet isotopique dû à ^3H_R est en accord avec les résultats de la littérature.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Dans la biosynthèse de la L-sérine à partir de la glycine et du formiate (dans le foie de rat), l'hydrogène provenant du formiate possède, dans le carbone 3 de la L-sérine, la configuration S avec une pureté optique d'environ 40 %.

Ce résultat implique :

- que la réduction du méthényle en méthylènetétrahydrofolate est stéréospécifique,

- que la transhydroxyméthylation est stéréospécifique.

Nous attribuons la perte partielle de la pureté optique à la dissociation non enzymatique du méthylènetétrahydrofolate.

L'utilisation de la méthode d'oxydation de l'éthanol par l'alcool-déshydrogénase de levure nous a fait découvrir l'existence d'un effet isotopique secondaire cinétique dû au tritium sur l'oxydation du (S)-éthanol-1-^{3}H.

L'ensemble de ces résultats constitue donc une contribution à l'étude du mécanisme de la transhydroxyméthylation dont bien des étapes restent encore à démontrer. Il apparaît maintenant que l'étude du sort des hydrogènes α de la glycine au cours de la biosynthèse de la L-sérine, permettrait de préciser une étape importante de la réaction.

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

INDICATIONS GENERALES

Les points de fusion non corrigés ont été pris sur banc Kofler : F_k, ou en capillaire : F_C, ou avec le microscope Reichert : F_R.

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN A-60 et pris en solution dans $CDCl_3$ ou dans D_2O, avec le tétraméthyl silane comme référence interne.

Les concentrations indiquées pour les $[\alpha]_D$ sont exprimées en grammes par 100 ml.

Les densités optiques ont été mesurées sur un spectrophotomètre JOUAN.

Les microanalyses ont été effectuées au laboratoire de microanalyses du C.R.M. à Strasbourg.

La méthode usuelle d'isolement comporte une extraction par solvant organique (éther, etc...) avec lavage de la phase organique par l'eau, soit par une solution diluée d'acide chlorhydrique, etc... suivie d'un séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant.

Chromatographie sur plaque :

a) plaque préparative : on utilise une plaque chargée de SiO_2 G Merck (25 g pour 60 ml d'eau par plaque de 20 x 20 cm). Avant l'emploi, on l'asperge avec une solution méthanolique de chlorhydrate de berbérine (150 mg par 100 ml). On élue avec un mélange d'acétate d'éthyle et de cyclohexane, puis révèle à la lampe U.V. Les bandes ainsi repérées correspondant aux produits sont récupérées, dispersées dans de l'éther ; puis on filtre la silice et évapore le solvant.

b) plaques à la cellulose : dans le cas des acides aminés, nous avons utilisé des plaques de cellulose MN 300 (Macherey, Nagel & C°). On élue avec un mélange de méthanol - eau - pyridine

(80, 20,4 v/v/v) et révèle les acides aminés par réaction avec la ninhydrine (99).

Enzymes et coenzymes. Origine : Boehringer,Mannheim (Allemagne)

a) alcool-deshydrogénase (levure) : 30 mg par ml de suspension, activité : 180 unités par mg ; mesure de l'activité : (100).

b) lactate-deshydrogénase (muscle) : 5 mg par ml de suspension, activité : 360 unités par mg ; mesure de l'activité : (101 a).

c) NAD : NAD - 86,5 %
NADH : NADH - 78,5 %

Produits radioactifs : - formiate de sodium-^{3}H 65 mC par mM. (C.E.A.)
- éthanol-1-^{3}H 100 mC par mM. (New-England Nuclear

- comptages : les comptages ont été effectués par des appareils "PACKARD - Tri Carb Liquid Scintillation Spectrometer"

scintillateurs : A/ I l toluène
6 g PPO
0,6 g diméthyle POPOP

B/ 4 g BBOT
80 g naphtalène
400 ml méthylcellosolve
600 ml toluène

Si l'échantillon est soluble dans le scintillateur, on emploie 10 ml de A ou de B. S'il n'est pas soluble, on utilise les systèmes suivants : 0,1 ml eau
2 ml éthanol absolu
10 ml A

ou

0,1 ml eau
10 ml B

mais dans ce cas, le rendement du comptage est inférieur.

Nous décrivons dans les chapitres suivants les conditions et les expériences types que nous avons reproduites au cours des diverses préparations et dégradations de la L-sérine-3-^{3}H.

CHAPITRE I

PREPARATION DE LA L-SERINE-3-^{3}H

1°) Milieu d'incubation :

Le milieu d'incubation est une solution tampon : pH = 7,4 (Standard Medium : S.M.) fraîchement préparée.

Composition :

	Concentration en g/ 100 ml
NaCl	0,72
$NaHCO_3$	0,25
KH_2PO_4	0,10
$MgSO_4$, 7 H_2O	0,06
glucose	0,10
citrate de sodium	0,03

Avant emploi, on sature d'oxygène le tampon à 100 ml de cette solution, on ajoute 2 ml d'une solution à 1 % de $CaCl_2$ (102).

2°) Incubation :

On utilise des rats mâles de taille moyenne ayant jeûné durant 18 h. On anesthésie le rat à l'éther, on perfuse le foie avec du S.M. froid. On enlève le foie, le lave, puis le découpe en fines tranches avec une lame de rasoir. On met une quinzaine de ces tranches dans un flacon contenant 5 ml de solution tampon, du ^{3}HCOONa, de la glycine et de la sérine. On effectue l'incubation à l'air avec agitation pendant 75 mn à 37° (10, 34, 55).

Incubation :	1	2	3	4	5	6	7
Nbre de flacons	3	3	3	3	3	4	4
Formiate	0,15	0,30	0,30	0,30	0,30	0,15	0,15
Glycine	0,22	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
L-sérine	1	1	1	1	1	1	1
L-sérine (ajoutée après incubation)	10	10	6	5	5	4	4
	Sér I		Sér II	Sér III		Sér IV	

Concentrations : en mg/flacon

3°) Isolement de la sérine :

A la fin de l'incubation, on ajoute dans chaque flacon de la L-sérine non marquée. On filtre le milieu d'incubation, on lave, puis broie les tranches de foie et l'on filtre à nouveau. On précipite les protéines par l'addition d'acide trichloracétique (concentration finale de TCA : 10 %). On extrait à l'éther l'excès d'acide trichloracétique, puis l'on réduit la phase aqueuse sous vide à 2-3 ml.

a) Désionisation de la solution :

On fixe les acides aminés sur une résine échangeuse de cations : permutite 50 (Colonne : 1 x 15 cm).

Avant usage, on lave la colonne avec une solution d'acide chlorhydrique 2N (300 ml), puis avec de l'eau (1000 ml). On verse la solution ci-dessus sur la colonne, puis de l'eau (150 à 200 ml) : on règle le débit à 15 gouttes par mn. On élue les acides aminés par de l'ammoniaque 2N (200 ml) et on évapore à sec sous vide (103 a, 104).

b) Séparation des acides aminés : (105, 106)

On utilise une colonne de Dowex 50 x 8 (50/100 mesh) (2 x 30 cm). On prépare préalablement la résine (103 b) ; au moment de l'emploi, on la met sous forme H^+ avec de l'acide chlorhydrique 2N (500 ml), puis on l'équilibre avec une solution 1,5N (débit : 1 ml par minute). On met sur la colonne les acides aminés dissouts dans 3 ml d'acide chlorhydrique 1,5N, puis on élue avec le même débit par la même solution.

On recueille des fractions de 10 ml. Par chromatographie sur couches minces de cellulose, on repère le pic de la sérine (Fractions 10 à 18) qui n'est contaminé que par de l'acide glutamique. On reprend le chlorhydrate de sérine obtenu après évaporation des fractions dans un minimum de méthanol ; on libère la sérine par addition de triéthylamine. On évapore le solvant sous vide, rajoute de la sérine non marquée (250 mg), on recristallise dans H_2O/EtOH.

Suivant la radioactivité obtenue, on rajoute de la L-sérine non marquée ou réunit le produit de deux incubations. La sérine marquée est ensuite recristallisée jusqu'à radioactivité constante (environ 6 fois).

C H A P I T R E II

A/ PREPARATION DU CHLORHYDRATE DE L'O-BENZOYL-L-SERINE 11

a) Méthode par le complexe de cuivre (37) -(Dégradation I)

- Préparation du complexe : à une solution de L-sérine (480 mg ; 4,55 mM) dans de l'eau (3-4 ml), on ajoute du carbonate de cuivre (1,5 g). Après avoir chauffé au bain-marie le mélange durant 15 mn, on filtre l'excès de carbonate et le lave à l'eau. Le filtrat est bleu intense.

- Benzoylation : on refroidit à 0° la solution du complexe de cuivre de la sérine et ajoute du chlorure de benzoyle (1 ml ; 7 mM) en 4 portions, on maintient le pH entre 7 et 9 par des additions successives de soude N. La réaction nécessite une trés forte agitation. L'ester, bleu clair, précipite ; on le filtre après consommation du réactif et on le dissout dans de l'acide chlorhydrique 0,5N (40 ml). On obtient une solution verte et on filtre l'acide benzoïque.

- Isolement de l'O-benzoyl-sérine, HCl : le complexe est détruit par l'acide sulfhydrique; on filtre le sulfure de cuivre sur Clarcel, puis on évapore la solution à sec sous vide. On reprend le résidu dans du méthanol, on se débarasse du chlorure de sodium par filtration et cristallise le dérivé par addition d'éther (600 mg ; Rdt = 53 %)

F_c = 170 - 171° (décomposition).

b) Méthode de la triple protection - (Dégradation IV)

- N-Carbobenzoxy-L-sérine : 12. A une solution aqueuse (20 ml) de L-sérine (505 mg ; 4,8 mM) et de bicarbonate de sodium (1700 mg, 20 mM), on ajoute du chloroformiate de benzyle (1 ml ; 7 mM). On agite vigoureusement l'ensemble durant 4 h. Après avoir extrait

l'excès de réactif à l'éther, on refroidit la phase aqueuse à 0°, puis acidifie avec de l'acide chlorhydrique concentré tout en maintenant une forte agitation. On filtre le dérivé qui a cristallisé. On extrait 3 fois les eaux mères par l'acétate d'éthyle, on sèche sur sulfate de sodium, puis évapore à sec sous vide (39). On obtient la N-carbobenzoxy-L-sérine (1,123 g ; Rdt = 98 % ; cristaux et extrait rassemblés).

F_k = 119° (Litt. (39) : F = 119,5°)

- Ester benzylique de la N-carbobenzoxy-L-sérine: 13

On dissout la N-carbobenzoxy-L-sérine (1,123 g) dans de l'acétate d'éthyle (20 ml) ; on ajoute de la triéthylamine (1,1 ml ; 7,7 mM) et du chlorure de benzyle (0,9 ml ; 7,7 mM). On chauffe à reflux la solution, sous azote pendant 36 h (41). Après avoir filtré le chlorhydrate de triéthylamine, on lave le filtrat par une solution d'acide chlorhydrique N, puis par une solution saturée de bicarbonate de sodium, on sèche sur sulfate de sodium et évapore à sec sous vide. Après recristallisation dans un mélange de chloroforme et d'éther de pétrole, on recueille l'ester benzylique (1,250 g ; Rdt = 80 %).

F_k = 84° (Litt. (40) : F = 84-85°)

- Ester benzylique de la N-Cbo,O-benzoyle-L-sérine : 14

On dissout le dérivé 13 (1,25 g) dans de l'acétate d'éthyle (10 ml), on ajoute de la triéthylamine (0,8 ml ; 5,6 mM) et du chlorure de benzoyle (0,8 ml ; 5,6 mM). Le chlorhydrate de triéthylamine précipite rapidement ; on le filtre au bout de 4 h. Le filtrat est traité comme ci-dessus. On recristallise le dérivé dans un mélange de chloroforme et d'éther de pétrole (1,610 g ; Rdt = 95 %).

F_c = 95° $[\alpha]_D$ = -17° (c = 0,50 , AcOEt)

Analyse : $-C_{25}H_{23}NO_6$ Calc. % : C 69,27 H 5,35
Tr. : 69,04 5,28

- Chlorhydrate de l'O-benzoyl-L-sérine : 11

On dissout le dérivé 14 dans de l'acide acétique (25 ml) on ajoute de l'acide chlorhydrique concentré (0,4 ml) et du palladium

sur charbon (10 % ; 150 mg), on agite la solution pendant 2 h 1/2 sous hydrogène, à pression ordinaire (40). On filtre le catalyseur puis le disperse dans de l'éthanol, on filtre à nouveau et réunit les deux filtrats que l'on évapore à sec sous vide. On obtient le chlorhydrate de l'O-benzoyl-L-sérine, que l'on recristallise dans un mélange de méthanol et d'éther (770 mg ; Rdt = 85 %).

F_c = 170-171° (déc.) $[\alpha]_D$ = +13° (c = 0,48 ; MeOH)

O-benzoyl-L-sérine : on ajoute la quantité stoechiométrique de triéthylamine à une solution de chlorhydrate de l'O-benzoyl L-sérine dans le minimum de méthanol. On filtre l'O-benzoyl-L-sérine que l'on recristallise dans l'eau.

F_c = 127-128° (déc.) $[\alpha]_D$ = +12° (c = 0,47 ; HClN)

Analyse : $C_{10}H_{11}NO_4$ Calc. % : C 57,41 H 5,30
Tr. : 57,84 5,51

B/ DEGRADATION DU CHLORHYDRATE DE L'O-BENZOYL-L-SERINE EN ETHANOL

- Acide benzoyl-oxy-3-glycérique : 15 (Dégradation IV)

On dissout le chlorhydrate de l'O-benzoyl-L-sérine (760 mg ; 3,1 mM) dans un mélange d'eau et d'acide acétique (1/1 ; 4 ml) et refroidit la solution avec de la glace. On ajoute par petites portions du nitrite de sodium (600 mg ; 8,7 mM) puis laisse reposer pendant la nuit (107). On chasse l'excès d'acide nitreux par barbottage d'azote à la température ordinaire, puis lyophilise pour se débarasser des solvants.

- O-benzoyl-glycolaldéhyde : 16

Au résidu de la lyophilisation on ajoute du dioxanne anhydre (15 ml) et du tétracétate de plomb soigneusement séché sous vide (1,4 g). On catalyse la réaction par l'addition de trois gouttes d'eau, puis on agite magnétiquement la solution, sous azote, pendant 4 h. On neutralise par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (1,4 g),

le carbonate de plomb précipite ; on filtre sur Clarcel et on lave le résidu avec du méthanol.

- Mono O-benzoyl-glycol : 17

On ajuste à 7 le pH de la solution ci-dessus par l'addition de borohydrure de sodium, on obtient ainsi un milieu fortement tamponné. Tout en agitant, on rajoute du borohydrure de sodium (en tout : 300 mg) et prend garde à maintenir le pH inférieur à 8 par l'addition d'acide acétique. Après 45 mn, on extrait 3 fois à l'éther, sèche sur sulfate de sodium et évapore à sec sous vide. On isole le produit par chromatoplaque préparative (éluant : cyclohexane, acétate d'éthyle 1/1), on le distille à 40° sous un vide de 0,01 mm Hg (220 mg ; Rdt = 43 % depuis 15). Le mono O-benzoyl-glycol cristallise s'il est suffisamment pur.

F_c = 36-37° (Litt. (108) : F = 36,5-37,5°)

- Tosylate de l'O-benzoyl-glycol : 18

On ajoute à 0°, par petites portions, du chlorure de p-toluènesulfonyle (400 mg) à une solution de 21 (210 mg) dans de la pyridine (5 ml). Après 18 h à froid on ajoute de la glace pilée pour hydrolyser l'excès de réactif. On filtre le produit cristallisé, le lave à l'eau (327 mg ; Rdt = 75 %). On recristallise 2 fois dans un mélange éthanol-eau (294 mg).

F_c = 75°

Analyse : $C_{16}H_{16}O_5S$	Calc. %	:	C	59,99	H	5,09
	Tr.	:		59,99		5,10

- Benzoate d'iodo-2 éthyle : 19

On laisse pendant la nuit, sous azote, à température ordinaire une solution du tosylate 18 (280 mg ; 0,875 mM) et d'iodure de sodium (1,0 g) dans de l'acétone anhydre. Après avoir filtré le p-toluènesulfonate de sodium, on complète la réaction par un chauffage sous reflux de 2 h (31). Le filtrat est évaporé par un courant d'azote On ajoute de l'eau au résidu et l'extrait 3 fois à l'éther. On lave la

phase éthérée par une solution de thiosulfate de sodium (0,5 N), puis par de l'eau, puis on la sèche et évapore l'éther. On dissout aussitôt le résidu dans du méthanol anhydre (20 ml) pour effectuer de suite la réaction d'hydrogénolyse.

- Benzoate d'éthyle : 20

On ajoute à la solution ci-dessus de la diéthylamine (0,4 ml) et du palladium sur carbonate de calcium (5 %). On hydrogénolyse l'iodure 19 par agitation sous atmosphère d'hydrogène à pression ordinaire. La réaction est complète après 30 mn ; on filtre le catalyseur et évapore le solvant, on extrait le benzoate d'éthyle à l'éther (105 mg ; Rdt = 80 % depuis 18).

- Ethanol:21

On agite une suspension de benzoate d'éthyle (105 mg) dans une solution de potasse (700 mg dans 4 ml d'eau). Après 18 h, la saponification est complète. On lyophilise, on ajuste le volume à 5 ml : la solution d'éthanol obtenue est prête pour la détermination enzymatique.

C/ DIVERS

- Oxydation de l'éthanol en acide acétique :

On lyophilise les eaux-mères du dérivé de l'acétaldéhyde (dégradation II) pour obtenir une solution aqueuse contenant de l'éthanol marqué (la dimédone n'est pratiquement pas entraînée). Après avoir ajouté du réactif de Kuhn Roth (4 ml : 6,7 g CrO_3 , 12,5 ml H_2SO_4 concentré, 50 ml H_2O) on chauffe sous reflux pendant 30 mn puis distille à la flamme, on reprend 4 fois le résidu par de l'eau et redistille. On neutralise le distillat avec de la soude 0,01 N (42 ml), puis on évapore à sec sous vide. L'acétate de sodium obtenu est transformé en acétate de p-phénylphénacyle par du bromure de p-phénylphénacyle (15 mg) (voir p.67). Le dérivé est recristallisé dans un mélange éthanol/eau (4 mg).

F_c = 110° (Litt. (109) : F = 111°)

Le dérivé est identique à un échantillon de référence préparé de la même manière (point de fusion mélange).

- Dégradation dans de l'eau lourde :

On a préparé à partir du chlorhydrate de l'O-benzoyl-L-sérine (préparé à partir de L-sérine non marquée) le mono O-benzoyl glycol et le tosylate correspondant dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment mais lors de la désamination, de la coupure au tétracétate de plomb et de la réduction au borohydrure de sodium on remplace l'eau par de l'eau lourde (D_2O à 98,5 %).

- spectre de RMN du mono O-benzoyl glycol ($CDCl_3$) : on observe deux quartets correspondant aux méthylènes, centrés à 4,4 et 3,9 ppm. L'intégration donne un nombre équivalent de protons pour les deux positions (32 et 31 mm).

- spectre de RMN du tosylate de l'O-benzoyl glycol ($CDCl_3$) : méthyle du noyau aromatique δ = 2,4 ppm.
  Les méthylènes sont confondus en un multiplet centré à 4,5 ppm.
  L'intégration donne un rapport de 3 à 4 pour les aires des 2 pics : 7,9 et 10,4.

- Dilution du tosylate 18 :

Au cours des dégradations I, II et III nous avons dilué le tosylate 18, obtenu à partir de la L-sérine marquée, avec du tosylate inactif préparé à partir d'éthylène glycol.

CHAPITRE III

DETERMINATION DE LA CONFIGURATION DE L'ETHANOL 1-^{3}H

1°) Contrôle spectrophotométrique des réactions enzymatiques :

Les réactions sont suivies par la mesure de concentration de NADH à 366 mμ. A cette longueur d'onde le NADH présente un coefficient d'extinction molaire égal à 3300 $mole^{-1}$ cm^{-1}.

On pipette 1 ml d'une solution 100 fois diluée du mélange réactionnel dans une cuve (l = 1 cm) et porte le volume à 3 ml par addition d'eau. Les mesures sont faites par rapport à une solution de même dilution, sans enzyme. Dans ces conditions une augmentation de 0,1 de la densité optique correspond à un accroissement de 9,1μ M/ml de la concentration de NADH.

2°) Oxydation de l'éthanol (Dégradation IV)

A la solution d'éthanol, (obtenu par dégradation) on ajoute une solution de pyrophosphate de sodium (0,2 M) (5 ml) et de NAD^+ (500 mg) ; on ajuste le pH du milieu à 10 avec une solution de soude N. On ajoute de l'alcool-deshydrogénase (ADH) (0,1 ml) et l'on maintient le pH supérieur à 10. On atteint l'équilibre après 30 à 45 mn avec la transformation d'environ 200μ M d'éthanol et de NAD . Après 45 mn, on gèle le milieu dans un mélange acétone/carboglace et l'on procède à la lyophilisation. Le résidu est conservé à froid. Le liquide obtenu, contenant l'éthanol qui n'a pas réagi et l'acétaldéhyde, est chauffé sous reflux pendant 15 mn en présence de dimédone (55 mg). Après refroidissement on ajuste le pH à 4,1, puis laisse le tout à froid. Après 48 h, on filtre le dérivé de l'acétaldéhyde (8 mg) ; on le recristallise dans un mélange éthanol-eau (6 mg).

F_C = 141-142° (Litt. (48) : F = 141-142°)

3°) Réduction du pyruvate (dégradation IV)

On dissout le résidu de la lyophilisation dans de l'eau (10 ml) puis on ajuste le pH à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique N. On ajoute une solution 0,1 N de pyruvate de sodium dans de l'eau (2 ml). On ajoute de la lactate deshydrogénase (LDH) (0,1 ml). Après 35 mn on arrête la réaction (105 µM ont réagi) en chauffant au bain-marie pendant 2 mn. On acidifie le milieu avec une solution d'acide sulfurique à 50 % (1 ml) puis extrait en continu à l'éther pendant 36 h. On chasse l'éther d'extraction, par un courant d'azote, on ajuste le résidu aqueux (2 ml) à pH = 6 par l'addition de bicarbonate de sodium. On ajoute une solution de bromure de p-phénylphénacyle (15 mg ; 54 µ M) dans de l'éthanol (2ml). Après 2 h de reflux, on évapore l'éthanol, on ajoute quelques ml d'eau, puis extrait 2 fois avec de l'éther. On sépare le dérivé sur une petite chromatoplaque préparative et cristallise dans un minimum d'éthanol (7 mg)

F_C = 149°

Le produit est identique à un échantillon préparé à partir d'acide L-lactique (F ; R_F) :

F_K = 149° $\quad [\alpha]_D$ = +3° (c = 0,57 ; $CHCl_3$)

Analyse : $C_{17}H_{16}O_4$ Calc. % : C 71,82 H 5,67

Tr. : 71,59 5,58

C H A P I T R E IV

ETUDE DES REACTIONS ENZYMATIQUES AVEC L'ETHANOL-1-^{3}H

Afin de déterminer avec précision l'activité de l'éthanol-1-^{3}H utilisé, nous l'avons transformé en phényluréthane. Dans tous nos essais nous avons régénéré l'éthanol par saponification de la même quantité de dérivé (165 mg ; 1 mM).

1°) Préparation du phényluréthane à partir d'éthanol-1-^{3}H racémique :

A la solution d'éthanol-1-^{3}H * (0,015 ml) on ajoute de l'éthanol absolu (1 ml) du diméthoxyéthane-1,2 (10 ml) et de l'isocyanate de phényle (3 ml). On laisse la nuit à température ordinaire puis complète la réaction par un chauffage sous reflux de 1 h 1/2. Après avoir évaporé le solvant sous vide, on reprend le résidu avec de l'éther de pétrole chaud et filtre la N,N'-diphénylurée. Le filtrat conduit au dérivé attendu qui cristallise à froid. On sublime 2 fois à 65-70° sous 0,05 mm Hg. (2100 mg ; R = 75 %) F_R = 89,5°.

Remarque :

On a recristallisé quelques dizaines de mg du dérivé dans de l'éther de pétrole et sublimé les cristaux et le résidu des eaux mères, les activités retrouvées sont toutes comparables :

phényluréthane :	- avant recristallisation :	6540 cpm/10 µM
	- après recristallisation :	6555 cpm/10 µM
	- eaux mères :	6470 cpm/10 µM

* Solution d'éthanol-1-^{3}H racémique : 2,3 mg d'éthanol-1-^{3}H (cf.p. 56) mélangés à 6 ml d'éthanol absolu.

2°) Préparation de l'(S)-éthanol-1-^{3}H :

On oxyde comme précédemment (chapitre III) en présence d'ADH et de NAD^+ (1000 mg), 10 gouttes de la solution d'éthanol-1-^{3}H en acétaldéhyde.

- Préparation de la N,N'-diphényl-2-méthylimidazolidine (110)

A la solution obtenue par lyophilisation, on ajoute de l'acide acétique (0,75 ml) et du chlorhydrate de N,N'-diphényléthylènediamine (60 mg) dissout dans un peu d'eau. Après 24 h à froid, on filtre le dérivé (27 mg), lave à l'eau, sèche, et l'utilise sans purification ultérieure.

Remarque : le dérivé de l'acétaldéhyde peut être recristallisé dans du méthanol F_K = 100° (Litt. (110) ; F = 102°).

- Régénération de l'acétaldéhyde-1-^{3}H :

On chauffe à 100° pendant 45 mn une suspension,en ampoule scellée (sous azote), du dérivé ci-dessus (27 mg) dans une solution d'acide phosphorique N (2 ml). L'hydrolyse est totale ; après avoir porté le volume à 2,5 ml on lyophilise.

- Réduction enzymatique de l'acétaldéhyde-1-^{3}H en (S)-éthanol-1-^{3}H

A la solution obtenue par lyophilisation, on ajoute une solution de pyrophosphate 0,2 N (2,5 ml). On ajuste le pH à 7,4 ajoute du NADH (100 mg) et de l'ADH (0,05 ml). Après 45 mn on gèle le milieu et lyophilise.

- Préparation du phényluréthane de l'(S)-éthanol-1-^{3}H :

A la solution obtenue par lyophilisation on ajoute 0,15 ml d'éthanol absolu (inactif) puis on distille l'azéotrope éthanol-eau que l'on recueille dans du méthoxyéthane-1,2 (10 ml). On laisse la solution pendant 24 h sur tamis moléculaires Merck (3 Å) , puis chauffe sous reflux pendant 2 h en présence d'isocyanate de phényle (0,8 ml). On isole le dérivé comme précédemment, on le sublime 2 fois, puis le recristallise dans de l'éther de pétrole et sublime à nouveau (190 mg).

3°) Saponification du phényluréthane :

On agite pendant une nuit une suspension de phényluréthane (165 mg ; 1 mM) dans une solution de soude N (4 ml) à 75-80°. Puis on ajuste le volume à 5 ml, et lyophilise : la solution obtenue est prête pour la détermination enzymatique.

4°) Réactions enzymatiques :

Nous avons opéré comme précédemment (chapitre III). Afin d'être toujours dans les mêmes conditions de concentration en NAD^+ nous avons d'abord dosé l'éthanol dans notre solution (101a) et utilisé 1,5 équivalent de coenzyme. Les précisions de pH et de temps de réaction ont été consignées dans la partie théorique. Nous avons utilisé des concentrations en dimédone de l'ordre de 0,9 à 1 équivalent.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

(1) R.L. BLAKLEY, J.Biol.Chem., 1963, 238, 2113.

(2) R.L. BLAKLEY, B.V. RAMASASTRI et B.M.Mc DOUGALL, J.Biol.Chem., 1963, 238, 3075.

(3) E.M. WILSON et E.E.SNELL, J.Biol.Chem., 1962, 237, 3180, 3171.

(4) I.A. ROSE, Ann.Rev.Biochem., 1966, 35 (1), 23.

(5) D.E. METZLER, M. IKAWA et E.E. SNELL, J.amer.chem.Soc., 1954, 76, 648.

(6) F.M. HUENNEKENS, H.R. WHITELEY et M.J. OSBORN, J.Cell.Comp.Physiol., 1959, 54, suppl.1, 109.

(7) E. BRODE et L. JAENICKE, Biochem.Z., 1960, 332, 259.

(8) D. SHEMIN, J.Biol.Chem., 1946, 162, 297.

(9) W. SAKAMI, J.Biol.Chem., 1948, 176, 995.

(10) R.L. BLAKLEY, Biochem.J., 1954, 58, 448.

(11) J.C. RABINOWITZ dans "The Enzymes", Vol.II p.185, par P.O. BOYER, H.A. LARDY et K. MYRBÄCK, Academic Press, New York, 1960.

(12) L. JAENICKE, Angew.Chem., 1961, 73, 449.

(13) M. FRIEDKIN, Ann.Rev.Biochem., 1963, 32, 185.

(14) L. JAENICKE et C. KUTZBACH dans "Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, 21, 183 par L. ZECHMEISTER. Springer Verlag. WIEN 1963.

(15) L. JAENICKE, Ann.Rev.Biochem., 1964, 33, 287.

(16) A. MEISTER, "Biochemistry of the amino acids", Vol.II , p.647, Academic-Press. New York, 1965.

(17) H.C.S. WOOD, Chem.Brit., 1966, 2, 536.

(18) L. JAENICKE et E. BRODE, Biochem. Z., 1961, 334, 108.

(19) H.R. WHITELEY et F.M. HUENNEKENS, J.Biol.Chem., 1962, 237, 1290.

(20) R.H. HIMES et J.C. RABINOWITZ, J.Biol.Chem., 1962, 237, 2915.

(21) K. UYEDA et J.C. RABINOWITZ, Arch. Biochem. Biophys., 1964, 107, 419.

(22) J.C. RABINOWITZ et W.E. PRICER Jr., J.amer.chem.Soc., 1956, 78, 5702.

(23) H. TABOR et L. WYNGARDEN, J.Biol.Chem., 1959, 234, 1830.

(24) R.L. BLAKLEY et B.V. RAMASASTRI, J.Biol.Chem., 1964, 239, 112.

(25) R.L. KISLIUK , J.Biol.Chem., 1957, 227, 805.

(26) M.J. OSBORN, P.T. TALBERT et F.M. HUENNEKENS, J.amer.chem.Soc., 1960, 82, 4921.

(27) R.G. KALLEN et W.P. JENCKS, J.Biol.Chem., 1966, 241, 5851.

(28) a - L.G. SCHIRCH et M.MASON, J.Biol.Chem., 1962, 237, 2578
b - " " " 1963, 238, 1032.

(29) L.G. SCHIRCH et W.I. JENCKINS, J.Biol.Chem., 1964, 239, 3801.

(30) J.N. CORNFORTH, G. RYBACK, G. POPJACK, C. DONNINGER et G.SCHROEPFER, Biochem.Biophys.Res. Comm., 1962,9, 371.

(31) R.U. LEMIEUX et J. HOWARD, Canad.J.Chem., 1963, 41, 308.

(32) H. WEBER, J. SEIBL et D. ARIGONI, Helv.Chim.Acta, 1966, 49, 741.

(33) R.S. CAHN, C.K. INGOLD et V. PRELOG, Experientia, 1956, 12, 81.

(34) P. SIEKEVITZ et D.M. GREENBERG, J.Biol.Chem., 1949, 180, 845.

(35) P. KRUHØFFER, Biochem.J., 1951, 48, 604.

(36) P. PFEIFFER et W. CHRISTLEIT, J.Physiol.Chem., 1937, 245, 197.

(37) A.C. KURTZ, J.Biol.Chem., 1949, 180, 1265.

(38) T.T. OTANI et H. WINITZ, Arch.Biochem.Biophys., 1963, 102, 464.

(39) S. GUTTMANN et R.A. BOISONNAS, Helv.Chim.Acta., 1958, 41, 1852.

(40) E. BAER et J. MAURUKAS, J.Biol.Chem., 1955, 212, 25.

(41) E. WÜNSCH et J. JENTSCH, Ber.deutsch.Chem.Ges., 1964, 97, 2490.

(42) R. CRIEGGE, Neuere Methoden der Präparativen organischen Chemie, Vol. 1, p.21, Verlag-Chemie, 1963.

(43) A. STOJILJKOVIC, V. ANDREJEVIC et M.L.J. MIHAILOVIC,Tetrahedron, 1967, 23, 721.

(44) E. BAER, J.M. GROSHEINTZ et H.O.L. FISCHER, J.amer.chem.Soc., 1939, 61, 2607.

(45) R. CRIEGEE et E. BÜCHNER, Ber.deutsch..Chem.Ges., 1940, 73, 563.

(46) R.C. HOCKETT, M.T. DIENES et H.E. RAMSDEN, J.amer.chem.Soc., 1943, 65, 1474.

(47) R. CRIEGEE, Annalen, 1932, 495, 211.

(48) J.H. RIDD, Quart.Rev., 1961, 15, 418.

(49) K.A. SCHELLENBERG, J.Biol.Chem., 1965, 240, 1166.

(50) C. DJERASSI, D.H. WILLIAMS, H. BUDZIKIEWICZ et Z. PELAH, Monatsh., 1964, 95, 166.

(51) H.F. FISHER, E.E. COHN, B. VENNESLAND et F.H. WESTHEIMER, J.Biol. Chem., 1953, 202, 687.

(52) F.A. LOEWUS, F.H. WESTHEIMER et B. VENNESLAND, J.amer.chem.Soc., 1953, 75, 5018.

(53) H.E. LEVY et B. VENNESLAND, J.Biol.Chem., 1957, 228, 85.

(54) E.C. HORNIG et M.G. HORNIG, J.Org.Chem., 1946, 11, 95.

(55) J.H. YOE, et L.C. REID, Analyt.Chem., 1941, 13, 238.

(56) E.A. EVANS dans "Tritium and its compounds" p.217 , Butterworths, London, 1966.

(57) H.R. LEVY, P. TALADAY et B. VENNESLAND, dans P.B.D. de la MARE et W. KLYNE "Progress in Stereochemistry", Vol.3, p.299, Butterworth, London 1962.

(58) R. Mc LEOD, H. PROSSER, L. FICKENTSCHER, J. LANYI et H.S. MOSHER, Biochem., 1964, 3, 838.

(59) J. VAN EYS et N.O. KAPLAN, J.amer.chem.Soc., 1957, 79, 2782.

(60) a - T.C. BRUICE et S. BENKOVIC dans "Bioorganic Mechanisms, Vol.2 p.309, Ed. par .W.A.BENJAMIN, Inc., New York-Amsterdam, 1966.

b - Vol. 2 , p.226

c - Vol. 2 , p.378.

(61) C. MITOMA et D.M. GREENBERG, J.Biol.Chem., 1952, 196, 599.

(62) M.J. OSBORN, E.W. VERCAMER, P.T. TALBERT et F.M. HUENNEKENS, J.amer. chem.Soc., 1957, 79, 6565.

(63) a - R.L. BLAKLEY, Biochem. J., 1959, 72, 707

b - " " 1960, 74, 71.

(64) M.L. BENDER et R. BRESLOW dans "Comprehensive Biochemistry, Vol.2, p. 153, Edité par M.FLORKIN et E.H. STOTZ, Elsevier, Amsterdam,

New York, 1962.

(65) a - F.H. WESTHEIMER, "The Enzymes", Vol. 1, p.261
b - " " Vol. 1, p.269.

(66) A.E. BRAUNSTEIN, "The Enzymes", Vol. 2, p.113.

(67) a - H.O. HOUSE dans "Modern Synthetic Reactions" p. 197, Ed. par W.A. BENJAMIN, Inc., New York, Amsterdam, 1965.

b - p. 225
c - p. 207.

(68) J.E. FERNANDEZ et J.S. FOWLER, J.Org.Chem., 1964, 29, 402.

(69) J.H. BURCKHALTER, J.W. WELLS et W.J. MAYER, Tetrahedron Letters, 1964, 21, 1353.

(70) a - P.A.S. SMITH dans "Open chain nitrogen Compounds", Vol. 1, p.322, Ed. par W.A. BENJAMIN, Inc., New York, Amsterdam, 1965
b - Vol. 1, p. 325
c - Vol. 1, p. 57.

(71) H. HELLMANN et G. OPITZ, Angew.Chem., 1956, 68, 265.

(72) - W.P. JENCKS, dans "Progress in Physical Organic Chemistry", Vol. 2, p.63

(73) S.V. LIEBERMAN et E.C. WAGNER, J. Org. Chem., 1949, 14, 1001.

(74) R.G. KALLEN et W.P. JENCKS, J.Biol.Chem., 1966, 241, 5845.

(75) W. SAKAMI et I. UKSTINS, J.Biol.Chem., 1961, 236, P.C. 50.

(76) A.R. LARRABEE et J.M. BUCHANAN,J.amer.chem.Soc., 1961, 83, 4094.

(77) T. CROWELL et D.M. PECK, J.amer.chem.Soc., 1953, 75, 1075.

(78) J.D. ALBRIGHT et H. R. SNYDER, J.amer.chem.Soc., 1959, 81, 2239.

(79) A.S.M. SELIM et D.M.GREENBERG, J.Biol.Chem., 1959, 234, 1474.

(80) W.A. NEWTON, Y. MORINO et E.E. SNELL, J.Biol.Chem., 1965, 240, 124.

(81) M.L. BENDER et R. BRESLOW dans "Comprehensive Biochemistry", Vol.2 p.158.

(82) D.A. ARCHER et H. BOOTH, J.Chem.Soc., 1963, p.322.

(83) L.M. TREFONAS, R.L. FLURRY Jr., R. MAJESTE, E.A. MEYERS et R.P. COPELAND, J.amer.chem.Soc., 1966, 88, 2145.

(84) H. SIMON et D. PALM, Ber.deutsch.chem.Ges., 1960, 93, 1289.

(85) H. SIMON et HEUBACH, Z. Naturforsch., 1963, 18b, 159.

(86) H. SUND et H. THEORELL dans "The Enzymes", 1963, Vol.7 p. 77.

(87) E.A. HALEVI, dans "Progress in Physical Organic Chemistry" Vol. 1 p. 109, Ed. par S.G. COHEN, A. STREITWIESER Jr. et R.W. TAFT, Interscience, New York, London 1963.

(88) C.J. COLLINS dans "Advances in Physical Organic Chemistry", Vol.2 p. 60, Ed. par V. GOLD, Academic-Press, London New York, 1964.

(89) J. WELWART et P. LASZLO, Bull.Soc.Chim.France, 1966, p.2413.

(90) H. SIMON et D. PALM, Angew.Chem., 1966, 78, 993.

(91) V.J. SHINER Jr., H.R. MAHLER, R.H. BAKER Jr., et R.R. HIATT, Ann. Acad.Sci., 1960, 84, 583 (New York).

(92) A. STREITWIESER Jr., R.H. JAGOW, R.C. FAHEY et S.SUZUKI, J.amer.chem. Soc., 1958, 80, 2326.

(93) R.D. BEVILL, E.A. HILL, F. SMITH et S. KIRKWOOD, Canad.J.Chem., 1965, 43, 1577.

(94) Y. POKER, Proc.Chem.Soc., 1960, p.17.

(95) D. PALM, Z. Naturforsch.,1966, 21b, 540.

(96) H.R. MAHLER et J. DOUGLAS, J.amer.chem.Soc., 1957, 79, 1159.

(97) H.R. MAHLER, R.H. BAKER Jr. et V.J. SHINER Jr., Biochem., 1962, 1, 47.

(98) J.F. THOMSON, J.J. DARLING et L.F. BORDNER, Biochem.Biophys.Acta, 1964, 85, 177.

(99) M. JUTISZ et P. de la LLOSA, Bull.Soc.Chim.France, 1963, p. 2913.

(100) H.M. RAUEN, Biochemisches Taschenbuch, p.990, Springer-Verlag,1956.

(101) a - H.U. BERGMEYER, Methoden der enzymatischen Analysen , p. 738, Verlag-Chemie, 1962;
b - p. 285.

(102) T. WINNICK, F. FRIEDBERG et D.M. GREENBERG, J.Biol.Chem., 1948, 175, 117.

(103) a - M. JUTISZ dans "Chromatographie en Chimie Organique et Biologique (E. LEDERER), Vol. II, p.297, Paris - Masson et Cie, 1960.

b - Vol. II, p. 331.

(104) B. BOULANGER et G. BISERTE, Bull.Soc.Chim.France, 1951, 33, 1930.

(105) C.W. HIRS, S. MOORE et W.H. STEIN, J.amer.chem.Soc., 1954, 76, 6063.

(106) J.S. WALL, Analyt.Chem., 1953, 25, 950.

(107) W. TEILHEIMER, Synthetic Methods of Organic Chemistry, 1961, 15, 204.

(108) P.E. VERKADE, F.D. TOLLENAAR et T.A.P. POSTHUMUS, Rec.Trav.Chim., 1942, 61, 373.

(109) WILD, Characterisation of Organic Compounds , p.172, Cambridge University Press, 1948.

(110) H.W. WANZLICK et W. LÖCHEL, Ber.deutsch.Chem.Ges., 1953, 86,1963.

(111) H. WEBER, Promotionsarbeit Nr. 3591, p.13 Juris-Verlag, Zürich 1965.

(112) R.P. BELL, M.H.RAND et K.M.A. WYNE-JONES, Trans. Faraday, Soc., 1956, 52, 1093.

(113) R.P. BELL et B. DE B. DARWENT, Trans. Faraday Soc., 1959, 46, 34.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION : 1

- Généralités..... 1
- L'interconversion de la L-sérine et de la glycine. 3
  - Biosynthèse de la L-sérine à partir de la glycine et du formiate..... 4
  - But de notre travail : détermination de la stéréochimie de la transhydroxyméthylation.. 7

CHAPITRE I : DETERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE DU TRITIUM PROVENANT DU FORMIATE DANS LA L-SERINE-3-^{3}H.

METHODES ET RESULTATS..... 13
- Préparation de la L-sérine-3-^{3}H..... 13
- Dégradation de la L-sérine-3-^{3}H en éthanol-1-^{3}H... 14
- Détermination de la configuration absolue de l'éthanol-1-^{3}H..... 19
  - Résultats..... 23
- Conclusion..... 23

CHAPITRE II : DEROULEMENT STEREOCHIMIQUE DE LA BIOSYNTHESE DE LA L-SERINE..... 27
- Discussion..... 27
  - Conclusion..... 29
- Mécanisme de la transhydroxyméthylation..... 30
  - Déroulement stéréochimique de la transhydroxyméthylation..... 39

CHAPITRE III : ETUDE DES EFFETS ISOTOPIQUES SUR LA DETERMINATION ENZYMATIQUE DE LA CHIRALITE DE L'ETHANOL-1-^{3}H.. 43
- Effet isotopique dû à $^{3}H_{S}$..... 43
  - Conclusion..... 46
- Effet isotopique dû à $^{3}H_{R}$..... 48

Pages

CONCLUSION GENERALE : 49

PARTIE EXPERIMENTALE : 53

BIBLIOGRAPHIE..... 71

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde Thèse :

Modèles d'enzymes : les hydrolases

Strasbourg, le 17 Juin 1967
P. le Président du Jury, absent :

signé : G. OURISSON

VU

Strasbourg, le 17 Juin 1967

P. LE DOYEN,
L'assesseur,

signé : J. FRENKEL

VU et permis d'imprimer

Strasbourg, le 21 Juin 1967

Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université,

signé : M. BAYEN